

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

**Langat viiruse RNA polümeraasi ja replikaasi  
ekspressioonikonstruktide klonereimine ja analüüs**

Bakalaureusetöö

Lõputöö maht 12 EAP

Marilin Kuusk

Juhendajad

MD, DSc, Eva Žusinaite

MSc, Sandra Koit

TARTU 2020

# INFOLEHT

Käesoleva bakalaureusetöö esimene pool annab ülevaate flaviviiruste leviku, patogeensuse, infektsioonitsükli, genoomi ülesehituse ja replikasiooni kohta. Eksperimentaalses pooles valmistati neli ekspressioonikonstrukti: Langat viiruse replikaasi (mittestruktuursed valgud 1-5), polümeraasi (mittestruktuurne valk NS5) ja nende polümeraas-inaktiivsed versioonid ning uuriti valmistatud konstruktide ekspressiooni koekultuuris.

Märksõnad: flaviviirused, Langat viirus, replikaas, RNA polümeraas (NS5)

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

The first part of given Bachelor's thesis gives an overview of the pathogenesis, infectious cycle, genome and replication of flaviviruses. In the experimental part, four expression constructs: Langat virus replicase (non-structural proteins 1-5), polymerase (non-structural protein 5) and their respective versions with inactivated polymerase were cloned and their ability to express respective proteins was assessed in cell culture.

Keywords: flaviviruses, Langat virus, replicase, RNA polymerase (NS5)

CERCS: B230 Microbiology, Bacteriology, Virology, Mycology

# SISUKORD

<b>KASUTATUD LÜHENDID .....</b>	<b>5</b>
<b>SISSEJUHATUS.....</b>	<b>6</b>
<b>1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Flaviviirused .....</b>	<b>7</b>
1.1.1 Iseloomustus.....	7
1.1.2 Levik ja patogeensus .....	7
1.1.3 Virion .....	8
1.1.4 Genoom.....	9
1.1.5 Infektsioonitsükkel .....	11
1.1.6 Flaviviiruste translatsioon ja replikatsioon .....	12
<b>1.2 Langat viirus (LGTV) .....</b>	<b>13</b>
<b>2. EKSPERIMENTAALOSA.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Töö eesmärgid .....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Materjalid ja metoodika.....</b>	<b>15</b>
2.2.1 Plasmiidid .....	15
2.2.2 Söötmel ja rakuliinid .....	16
2.2.3 Lahused ja puhvrid .....	16
2.2.4 PCR, geelelektroforees ja geelist puhastamine.....	17
2.2.5 SPLICE-PCR.....	18
2.2.6 Ligatsioon pJet1.2 vektorisse .....	19
2.2.7 XL-10 rakkude transformatsioon kuumašoki meetodil .....	19
2.2.8 pJet1.2-Blunt vektori plasmiidse DNA paljundamine minipreparatsioonmeetodil, restriksioonanalüüs ja sekveneerimine .....	20
2.2.9 PCR-mutagenees.....	20
2.2.10 Kloneerimine.....	22
2.2.11 Midipreparatsioon pcDNA vektori põhjal konstruktide jaoks.....	24
2.2.12 Indutseeritud maxipreparatsioon pCCI-BAC vektori põhjal konstruktide jaoks	25
2.2.13 U2OS rakkude transfektsioon .....	25
2.2.14 Immunofluorestsentsanalüüs .....	26
2.2.15 Western blot .....	27
<b>2.3 Tulemused ja arutelu.....</b>	<b>28</b>
2.3.1 Kloneerimine.....	28
2.3.2 Immunofluorestsentsanalüüs .....	40

2.3.3	Western blot analüüs .....	42
2.3.4	Sekveneerimine.....	44
2.3.5	Arutelu.....	44
<b>KOKKUVÕTE .....</b>		<b>46</b>
<b>RESÜMEE/ SUMMARY .....</b>		<b>47</b>
<b>TÄNUSÕNAD.....</b>		<b>49</b>
<b>KASUTATUD KIRJANDUS.....</b>		<b>50</b>
<b>KASUTATUD VEEBIAADRESSID .....</b>		<b>54</b>
<b>LISAD .....</b>		<b>55</b>
<b>LIHTLITSENTS.....</b>		<b>58</b>

## KASUTATUD LÜHENDID

- (+)ssRNA – positiivse polaarsusega üheahelaline RNA
- (-)ssRNA – negatiivse polaarsusega üheahelaline RNA
- Ah – aminohape/aminohappejääk
- Ap – aluspaar
- BSA – *bovine serum albumin*, veiseseerumi albumiin
- CMV – cytomegaloviirus (promooteri kontekstis)
- DAPI - 4',6-diamidino-2-fenüülindool
- DENV – Dengue viirus
- DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DPBS – *Dulbecco's phosphate buffered saline solution*, Dulbecco fosfaat-puhferdatud soolalahus
- E – *envelope*, ümbris
- (E)CDC – (*European*) *Centre for Disease Prevention and Control*, (Euroopa) Haiguste Kontrolli ja Tõrje keskus
- EDTA - *ethylenediaminetetraacetic acid*, etüleendiamiintetraatsetaathape
- EGFP – *enhanced green fluorescent protein*, ergastatud roheliselt fluorestseeruv valk
- ER – endoplasmaatiline retiikulum
- FCS – *fetal calf serum*, veiseloote seerum
- HRP – *horseradish peroxidase*, mädarõika peroksüdaas
- LB – *Lysogeny Broth*, lüsogeenne sööde
- LGTV – Langat viirus
- M – *membrane*, membraan
- NS – *non-structural*, mitte-struktuurne
- polü(A)/pA – poliadenüleeritud regioon
- SDS(-PAAG) – *sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel*, naatrium dodetsüülsulfaat – poliakrüülamiid geel
- SOC - *Super Optimal Broth with Catabolite repression*, super optimaalne sööde kataboliitide mahasurumisega
- ZIKV – Zika viirus
- UTR – *untranslated region*, transleerimata regioon
- WHO – *World Health Organisation*, Maailma Tervishoiu Organisatsioon
- WT – *wild-type*, metsiktüvi

## SISSEJUHATUS

Viirused on oma olemuselt nukleiinhapet omavad elus ja eluta piiri peal olevad bioloogilised objektid, kes on sarnasel kujul tõenäoliselt eksisteerinud alates elu tekke algusest (Krupovic *et al.*, 2019). Nad on obligatoorsed parasiidid, kes kasutavad ära peremeesorganismi masinavärki oma genoomi paljundamiseks ja pakkimiseks. Olles niivõrd kaua eksisteerinud, on nad arenenud nakatama pea kõiki: taimi, loomi, seeni, baktereid aga ka teisi viiruseid. Iga inimese sees võib igal ajahetkel leida mitmeid erinevaid viiruseid: enamasti ei ole nad meile kahjulikud ning võivad olla isegi kasulikud, hoides mikrobioomi kontrolli all, kuid on ka viiruseid, millega nakatumine võib põhjustada peremeesorganismile tõsiseid tervisehädasid või isegi surma. (Hill ja Sutton, 2019)

Kliima soojenemine, ülerahvastatus ja paremad võimalused reisimiseks on kaasa toonud paljude flaviviiruste leviku üle terve maailma; nende tõsine patogeensus on muutnud uute ravimite leidmise ja viiruse leviku piiramise veelgi olulisemaks. Näiteks alates 2015. aastast on avastatud Zika viiruse puhang vähemalt 42 riigis; suur kollapalaviku viiruse puhang esines 2016. aasta jaanuaris Angoola pealinnas Luandas ning on nüüdseks juba levinud sealt edasi riigi teistesse provintsidesse ja ka Kongo Vabariiki. Paar juhtumit on olnud ka Hiinas ja Ugandas. (WHO, 2016)

Eestis on flaviviirustest eelkõige levinud puukentsefaliidi viirused, mille peamine ohtlikkus seisneb kesknärvisüsteemi infektsioonides, nagu näiteks meningiit, entsefaliit või meningoentsefaliit (Kaiser, 2008). Pika- või eluaegsed kahjustused võivad tekkida 10-20% nakatunud inimestest. Aastatel 1973-2003 on kirjeldatud suurt tõusu puukentsefaliidi viirustega nakatumises: haigestumine on neljakordistunud, mistõttu on oluline neid viiruseid uurida, et leida efektiivsemaid ja ohutumaid ravimeid. (Süss, 2008)

Antud töö eesmärgiks oli valmistada Längat puukentsefaliidi viiruse (kui ohutu laborimudeli) replikaasi ja RNA polümeraasi ekspressioonikonstruktid ning uurida nende ekspressiooni koekultuuris. Töö viidi läbi Tehnoloogiainstituudis, rakendusviroloogia töörühmas.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Flaviviirused

### 1.1.1 Iseloomustus

Flaviviirused on väikesed (virionid on 40-60 nm läbimõõduga) positiivse polaarsusega RNA genoomiga viirused, mis põhjustavad nii inimestes kui ka loomades tõsiseid terviseprobleeme. Koos Pesti- ja Hepatsiviirustega moodustavad nad sugukonna *Flaviviridae*. Flaviviiruste nimetus tuleneb kollapalaviku viirusest (ladina keeles *flavus* - kollane), mis oli kõige esimene inimestele patogeenne isoleeritud viirus. (Staples ja Monath, 2008) Enamus neist kanduvad edasi läbi lülijalgsete ehk artropoodide, nagu näiteks moskiitod ja puugid, kuid on ka esindajaid, kelle puhul pole teada kas ja milliseid vektoreid nad kasutavad. Hetkel on kirjeldatud umbes 70 eri liiki flaviviiruseid, mille märkimisväärsamad esindajad on kollapalaviku, Dengue, Zika, West Nile ja entsefaliidiviiruste kompleksi esindajad. (Kuno *et al.*, 1998)

### 1.1.2 Levik ja patogeensus

Flaviviirused on levinud üle terve maailma, kuid teatud liigid on rohkem levinud spetsiifilistes regioonides, vastavalt sellele, kas nad kanduvad edasi moskiitode või puukide abil. Näiteks kollapalaviku viirus on levinud troopilistes ja subtroopilistes piirkondades nagu Aafrikas ja Lõuna-Ameerikas, Dengue viirus troopilistes piirkondades Aasias, Okeaanias ja Austraalias, Jaapani entsefaliidiviirus enamasti Kagu-Aasias ning puukentsefaliidi viirused valdavalt Euroopas ja Põhja-Aasias. (WHO, 2019; ECDC)

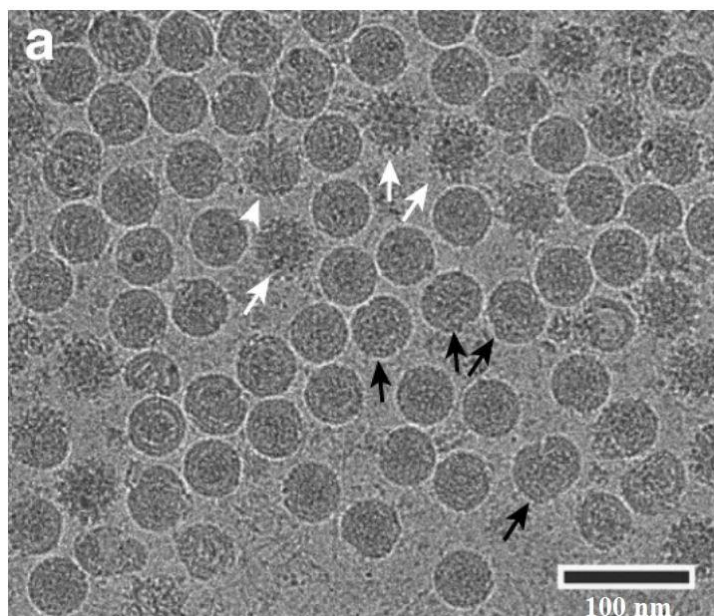
Suurem osa flaviviirustest põhjustavad inimestes tõsiseid tervisehädasid. Kollapalaviku korral kaotab nakatunu isu, esineb iiveldus ja kõrge palavik, naha kollakas värvus tekib maksakahjustusest, mis võib teatud juhtudel haigusega kaasneda (Monath ja Barrett, 2003). Ka Dengue viiruse nakkuse korral tekib palavik, aga ka oksendamine, lihasvalu ja Dengue viiruse nakkusele omane nahalööve (Murray *et al.*, 2013).

Puukentsefaliidi viirus-nakkuse korral eristatakse kolm peamist alatüüpi vastavalt nende levialale: Euroopa, Siberi ja Kaug-Ida regioonid. Hetkel on kirjeldatud umbes 14 kõva puugi (*Ixodes*) esindajat, kes suudavad viirust edasi kanda, kuid valdav enamus infektsioone tulevad liikidest *I. ricinus* ja *I. persulcatus*, harvemini võib ta inimesele kanduda ka läbi kehavedelike nagu näiteks nakatunud lehma pastöriseerimata piima, vereülekande või organdonorluse.

(Dumpis *et al.*, 1999; CDC, 2019) Nakkuse korral on peiteperiood 4-28, kuid keskmiselt 8 päeva. Seejärel võivad esimese nakkusfaasi jooksul tekkida kerge palavik, iiveldus ja oksendamine, mis mööduvad võrdlemisi kiirelt. Enne teist faasi võib Euroopa alatüübil esineda asümptomaatiline periood kuni 7 päeva. Nakkuse teise faasi jooksul võivad nakatunud tekkida neuroloogilised sündroomid nagu entsefaliit, meningiit või mõlemad ehk meningoentsefaliit. Lisaks suremusele, mis jääb 1-2% juurde, võivad paljudel nakatunud tekkida ka eluaegsed tüsistused, nagu näiteks jäsemete halvatus, ataksia, keskendumisraskused ja mäluprobleemid. (Yoshii, 2019; Chrdle *et al.*, 2016, *Tick-borne encephalitis*, 2020)

### 1.1.3 Virion

Flaviviiruste virion on ikosaeedriline, läbimõõduga umbes 50 nm. Küpse virioni membraani pinnal asetseb pulgakujuline ümbrise (E) valgu dimeer, mis on suunatud horisontaalselt mööda virioni pinda. (Yu *et al.*, 2008) Ebaküpset virioni on võimalik eristada selle järgi, et membraani valgu M asemel, on tema prekursor prM, mida on elektronmikroskoobis näha kui oga. (Joonis 1) Küpsemise käigus lõigatakse sellest proteolüütiliselt M valk, mille tulemusel struktuur muutub ümmargusemaks. (Stadler *et al.*, 1997) Küpsed virionid on keemiliselt stabiilsed kergelt aluselises keskkonnas (pH~8). Sarnaselt teistele viirustele, on virione võimalik inaktiveerida happelises keskkonnas, temperatuuril >40°C, orgaanilistes lahustes, detergentide ja UV kiirguse abil.



**Joonis 1.** Krüo-elektronmikroskoopiline pilt puukentsefaliidiviiruse virionidest. Valgete nooltega on tähistatud mitteküpsed virionid, valge noolepeaga poolküps virion ning mustade nooltega on tähistatud kahjustatud virionid. Kõik ülejäänud on küpsed virionid. (Füzik, *et al.*, 2018)



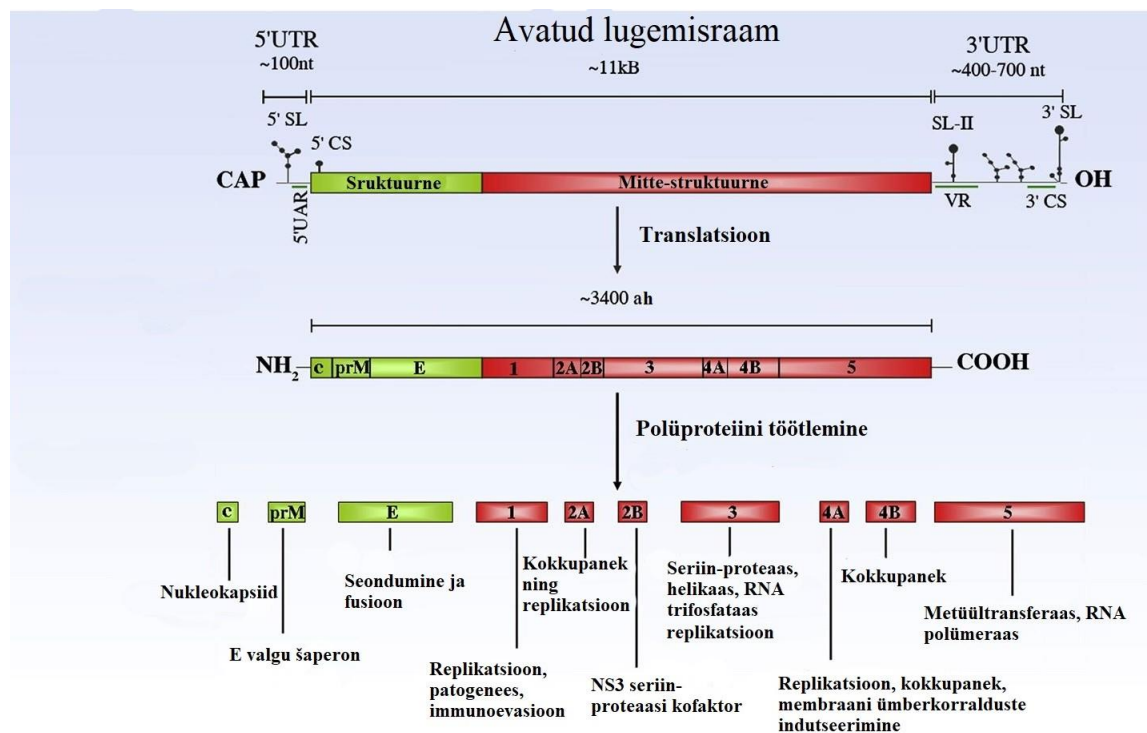
#### 1.1.4 Genoom

Flaviviiruste genoom on umbes 11 000 nukleotiidi pikk, mis jaguneb funktsionaalselt kaheks osaks: struktuurne ja mitte-struktuurne (edaspidi S, *structural*, NS, *non-structural*) osa. Genoomne (+)ssRNA toimib kui *messenger* RNA, mis sisaldab 5' otsas tüüp I *cap* struktuuri. (Lindenbach, 2001; Bollati *et al.*, 2010) Sarnaselt eukarüootsetele mRNA-dele on genoomi 5' otsas asuv *cap* struktuur oluline translatsiooni initsiatsiooniks ning kaitseks genoomi degradeerimise eest rakusiseste RNA nukleaaside poolt. (Bollati *et al.*, 2010) Märkimisväärselt puudub valdaval enamusel flaviviirustest polü(A) (polüandenüleeritud) saba, mis on vajalik translatsiooni alustamiseks eukarüootsetes rakkudes; polü(A) saba esineb vaid mõndadel puukentsefaliidi viirustel (Neudörfl ja Sofyn tüved). (Mandl, 1991) Teistel täidab selle rolli 3' otsas asuv juuksenõela (*stem loop*) struktuur (Ng *et al.*, 2017).

Flaviviiruste genoomi üks avatud lugemisraam kodeerib umbes 3400 aminohappejääki pika polüproteiini, mis ko- ja posttranslatsiooniliselt lõigatakse nii viiruse enda kui ka peremeesraku proteaaside poolt kolmeks struktuurseks ning seitsmeks mitte-struktuurseks valguks. Struktuurseid valke kodeeriv osa asub genoomi 5' terminaales pooles ja kodeerib kolme pakkimisvalku: nukleokapsiid (C), ümbris (E) ja membraani prekursor (prM); mittestruktuurseid valke kodeeriv osa ehk replikaas aga vastutab viiruse RNA paljundamise eest ning jagatakse komponentideks NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B ja NS5. (Joonis 2) (Lindenbach, 2001) Kuigi replikatsiooniks on vajalikud kõik mitte-struktuursed valgud, on enim uuritud just NS3 ja NS5 valgud nende ensümaatilise aktiivsuse tõttu. NS3 on 69 kDa suur mitmefunktsionaalne valk, mille N-terminaalne ots sisaldab seriin-proteaasi aktiivsust, mis on vajalik viiruse polüproteiini lõikamiseks ning C-terminaalne ots omab RNA trifosfataaset ja RNA helikaaset aktiivsust. Nimetatud RNA trifosfataas vastutab *cap* struktuuri lisamise ja RNA helikaas 3' transleerimata regiooni (3'UTR) osas asuva sekundaarstruktuuri lahtiharutamise eest, mis on vajalik genoomse RNA sünteesi initsiatsiooniks. (Bollati *et al.*, 2010)

NS5 on replikaasi suurim valk (103 kDa). Valgu N-terminaalses otsas asub metüültransferaasi domeen, mis samuti mängib rolli tüüp I *cap* struktuuri lisamises värskest sünteesitud RNA-dele ning C-terminaalses osas RNA polümeraasi domeen, mis on vajalik genoomse RNA replikatsiooniks. (Bollati *et al.*, 2010). Lisaks *cap*-I struktuuri lisamisele ja replikatsioonile, on Zika ja Dengue viiruste (ning tõenäoliselt ka teiste flaviviiruste) NS5 valgul kirjeldatud võimet suruda maha raku tüüp 1 ( $\alpha$  ja  $\beta$ ) interferoonvastust (Grant *et al.*, 2016; Morrison *et al.*, 2013). NS5 valgu RNA polümeraasi osa omab sarnaselt teistele RNA polümeraasidele parema käe

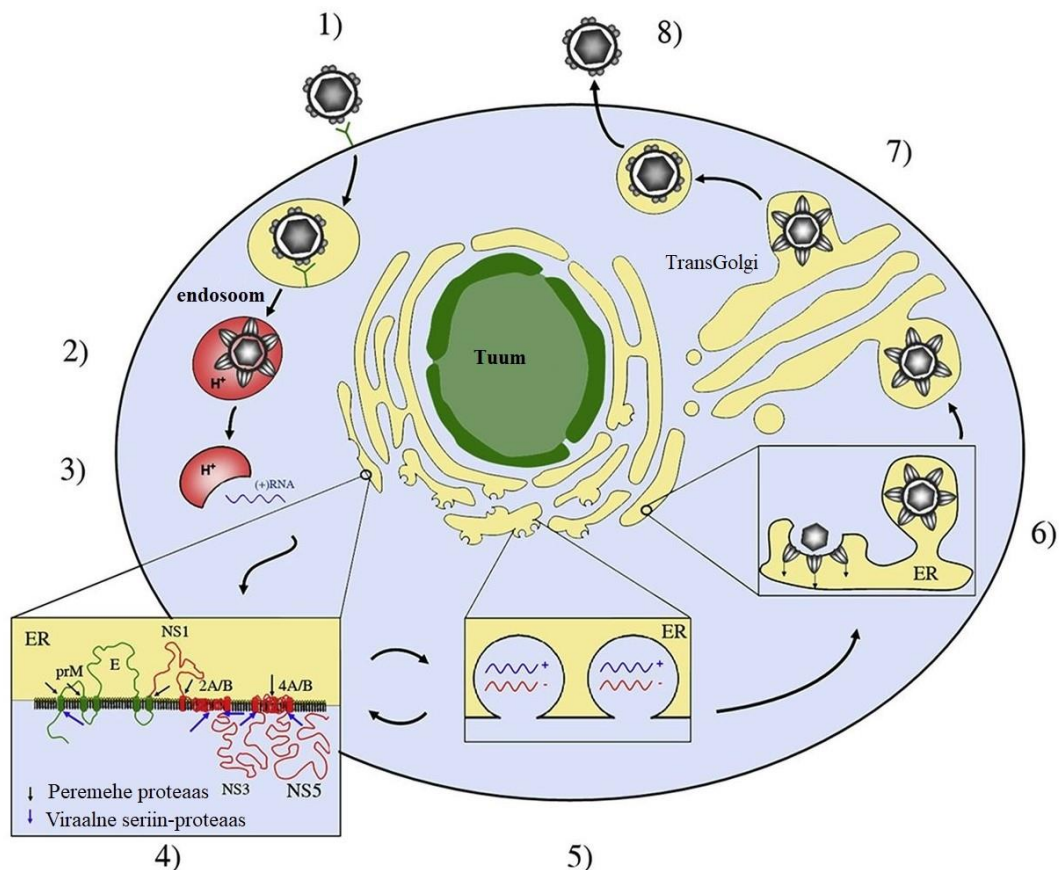
struktuuri (“peopesa”, “sõrmed” ja “pöial” domeenid), mille aktiivtsentris ehk “peopesas” asub GDD motiiv (glütsiin, aspartaathape, aspartaathape) (Selisko *et al.*, 2014). Nimetatud aminohappeline järjestus on absoluutselt vajalik RNA polümeraasi funktsionaalseks toimimiseks (Khromykh *et al.*, 1998). Viies sisse GDD → GAA mutatsioon (happeline aspartaat muutetakse neutraalseksalaniiniks) nimetatud aktiivtsentrisse, on võimalik polümeraasi inaktiveerida (Miorin *et al.*, 2008). Replikaasi kuuluvate teiste mitte-struktuursete valkude funktsioonid pole nii hästi uuritud, kuid on teada, et NS1 on glükoproteiin, mida vajatakse replikatsioonil; NS2B on NS3 proteaasi kofaktoriks võimaldades korrektset polüproteiini lõikamist; NS2A seondub genoomi 3’UTR regiooniga ning koos NS3 ja NS5-ga moodustavad replikatsioonikompleksi, samuti inhibeerib ta  $\alpha$  ja  $\beta$  interferoonide tootmist nakatunud rakkudes (Strauss ja Strauss, 2008; Uchil ja Satchidanandam, 2013). NS4A toimib kui valguline liigend NS1 ja replikatsioonikompleksi vahel. NS4B kohta on teada veelgi vähem. Tõenäoliselt mängib ta rolli virioni kokkupanekul. (Uchil ja Satchidanandam, 2013; Fernandez-Garcia *et al.*, 2009)



**Joonis 2.** Flaviviiruste genoomi organisatsioon ja viirusvalkude funktsioonid. Ainus lugemisraam kodeerib polüproteiini, mis ko- ja posttranslatsiooniliselt lõigatakse kolmeks struktuurseks valguks (märgitud rohelisega) ja seitsmeks mitte-struktuurseks valguks (märgitud punasega). Tähistatud on ka lihtsustatud RNA sekundaarstruktuurid, mis asuvad 3’ ja 5’ transleerimata regioonides. Ah – aminohape, C – kapsiidvalk, CS (*cyclisation sequence*) – tsükliisatsioonjärjestus, E – ümbris, M – membraan, SL – juuksenõela struktuur, VR – varieeruv regioon (Fernandez-Garcia *et al.*, 2009, muudatustega).

### 1.1.5 Infektsioonitsükkel

Flaviviirused sisenevad rakku läbi C-tüüpi lektiini retseptor-vahendatud endotsütoosi. Partiklid viiakse varajaste endosoomideni, mille happeline keskkond indutseerib konformatsioonilisi muutusi ümbrise glükoproteiinil ning see põhjustab viiruse ja peremehe membraanide liitumist. (Bressanelli *et al.*, 2004; Modis *et al.*, 2004) Viiruse antiparalleelsed E valgu homodimeerid eralduvad monomeerideks lõhkudes nii virioni ikosaedrilise kuju ning ühinevad siis uuesti paralleelseks homotrimeeriks, mille tagajärel vabaneb genoom tsütoplasmasse (Heinz ja Allison, 2000; Kielian *et al.*, 2000). Tsütoplasmasse vabanemisel sünteesitakse esmalt peremeesraku translatsioonimasina abil polüproteiin, mida hakatakse töötleva nii peremehe kui ka viiruse enda (NS2B/NS3) proteaaside poolt. Tekivad kolm struktuurset ja seitse mitte-struktuurset viirusvalku. Mitte-struktuurset valgud moodustavad replikaasi ning sellega algab viiruse RNA replikatsioon. Replikaas transkribeerib viiruse genoomse RNA (+) ahela pealt RNA (-) ahel, millest sünteesitakse omakorda uus RNA (+) ahel. Uus RNA (+) ahel saab alustada uue translatsiooni/replikatsioonitsükli või siis pakitakse see virionisse. Virioni pakkimine toimub karedapinnalise endoplasmaatilise retiikulumi (ER) pinnal. Värskest sünteesitud RNA seotakse C valguga ning pakitakse lipiidsesse kaksikkihti, mis sisaldab heterodimeerinä prM ja E valke. (Lorentz *et al.*, 2003, Mackenzie ja Westaway, 2001) PrM valk käitub tugipunktina, mis aitab vältida virionide enneaegset kokkupakkimist rakust väljatoimetamise ajal (Li *et al.*, 2008, Yu *et al.*, 2008). Pärast transportimist läbi raku sekretoorse tee, toimub virionide küpseks saamine trans-Golgi süsteemis läbi furiin-vahendatud lõikamise, pärast mida tekib prM-st M valk. Küpsed infektsioonivõimelised partiklid vabastatakse seejärel eksotsütoosi teel rakkude vaheruumi, kus nad hakkavad nakatama uusi rakke. (Joonis 3) (Fernandez-Garcia *et al.*, 2009)



**Joonis 3.** Flaviviiruste infektsiooniline elutsükkel. (1) Sisenemine toimub läbi retseptor-vahendatud endotsütoosi, mille käigus viirus viiakse varajaste endosoomideni. (2) Endosoomi happeline keskkond indutseerib viiruse ja peremehe membraanide liitumise, mille tagajärjel (3) vabaneb (+)ssRNA genoom. (4) Toimub translatsioon ja polüproteiini lõikamine. (5) Karedapinnalise ER membraanis moodustub replikaas, mis (+)ssRNA pealt sünteesib (-)ssRNA-d, mille pealt sünteesitakse uusi (+)ssRNA ahelaid. Uued (+)ssRNA ahelad alustavad uut translatsiooni/replikatsioonitsükli või siis (6) pakitakse nad virionisse. Pakkimine toimub ER pinnal, struktuursed valgud kompleksis (+)ssRNA-ga punguvad ER luumenisse. (7) Tekkinud mitteküpsed partiklid viiakse trans-Golgi süsteemi, kus läbi furiin-vahendatud lõikamise moodustub prM-st M valk. (8) Infektsioonivõimelised küpsed partiklid vabastatakse eksotsütoosi teel. (Fernandez-Garcia *et al.*, 2009, muudatustega).

### 1.1.6 Flaviviiruste translatsioon ja replikatsioon

Flaviviirused omavad positiivsuse polaarsusega RNA genoomi, mis tähendab, et genoomne RNA suudab käituda kui *messenger RNA*, mille pealt on võimalik sünteesida valke otse. Flaviviirused toodavad oma valke tsütoplasmas, ankurdades nad peremeesraku endoplasmaatilisele retiikulumile ning kasutades translatsiooniks ka tema ribosome (Werme *et al.*, 2008; Hasan, *et al.*, 2018). Tsütoplasmasse sisenedes sünteesitakse peremeesraku translatsioonimasina abil (+)ssRNA pealt polüproteiin, mida töödeldakse translatsioonijärgselt.

Kasutades nii peremeesraku signalaase kui ka viiruse enda NS2B/NS3 proteaas-kompleksi, lõigatakse polüproteiin kümneks osaks, mille nimetused ja funktsioonid on toodud välja joonisel 2. (Lindenbach, 2001) Mitte-struktuursed valgud moodustavad replikatsioonikompleksi, mille abil sünteesitakse positiivse RNA pealt esmalt negatiivse polaarsusega RNA, mille pealt on võimalik omakorda sünteesida uus positiivse polaarsusega RNA (Lindenbach *et al.*, 2007). Genoomi 3' ja 5' otstes asuvad tsükliatsiooni järjestused ning replikatsioonile eelnevalt genoom tsirkuleeritakse. Viiruse RNA polümeraas tunneb ära 5' otsas asuva juuksenõela struktuuri ning tänu tsükliatsioonile saab sealt liikuda 3' otsa, kus asub initsiatsioonikoht, ning alustab (-)ssRNA sünteesi 3'-5' suunas. Saadud negatiivse polaarsusega RNA jääb seotuks (+)ssRNA-ga, moodustades kaheaahelalise RNA kuni uue replikatsioonitsüklini. Uuel replikatsioonitsükli jälgitakse asümmeetrilise semikonservatiivsuse põhimõtet: positiivse ahelaga RNA-d sünteesitakse võrreldes negatiivsega ülehulgas ning iga uus sünteesitud positiivne ahel asendab kaheaahelalises RNA-s vana positiivse polaarsusega RNA, vabastades ta. Vabastatud positiivne RNA alustab uue translatiooni või siis pakitakse virioni. (Roby *et al.*, 2012)

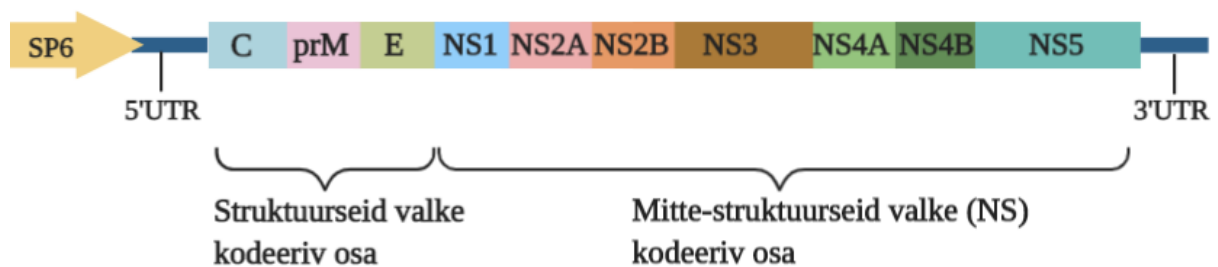
## 1.2 Langat viirus (LGTV)

Langat viirus isoleeriti esimest korda 1956. aastal Malaya piirkonnast (tänapäeval Malaisia) *Ixodes granulatus* liigi puugist (Gordon Smith, 1956). Ta kuulub puukentsefaliidi viiruste kompleksi koos Louping ill ja Powassan viirustega, mis võivad põhjustada entsefaliiti loomadel ja inimesel. Lähedalt on nendega seotud ka Omski hemorraagilise palaviku, Kyasanur Forest ja Alkhurma viirus, mis entsefaliiti ei põhjusta, kuid see-eest fataalseid verejookse küll. (Porterfield, 1975; Calisher, 1988; Gritsun, 2003) Looduses nakatab Langat viirus peamiselt erinevaid rottide ja hiirte liike nagu *Rattus muelleri validus* ja *Rattus sabanus vociferans*, kuid ei ole täheldatud, et infektsioon neile tõsisemaid tüsistusi valmistaks (Gritsun, 2003).

Tänu Langat viiruse madalale patogeensusele (inimestel pole seni haigust täheldatud), kuid suurtele sarnasustele teiste, patogeensemate, puukentsefaliidi viirustele, on seda varasemalt peetud heaks kandidaadiks puukentsefaliidi viiruse vastasele vaktsiinile. Niisiis on LGTV-d testitud mitmes elus-nõrgestatud vaktsiinis. (Shapoval, 1989; Pletnev ja Men, 1998) Shapovali ja tema kolleegide poolt uuritud vaktsiinis esines siiski liialt suur nakatumus entsefaliiti vaktsineerimise tagajärjel (~1:10 000 inimesest), samuti ei tekkinud ka täielikku immuunsust puukentsefaliidi viiruste vastu (Shapoval, 1989). Pletnev ja Men üritasid Langat viiruse tüvesid TP21 ja E5 nõrgestada kimäriseerides neid moskiitodega leviva Dengue viirusega. Nad leidsid,

et asendades E ja prM valgud Dengue viiruse omadega, vähenes neuroinvasioon hiirtes mitmekordselt. Siiski arvasid nad, et ideaalne puukentsefaliidi vastane vaktsiin peaks olema täielikult vaba igasugusest neurovirulentsusest. Lisaks pidasid nad vajalikuks enne kasutuselevõttu testida, kas valmistatud kimäär suudab immuunsust tekitada ka ohtlikematele puukentsefaliidi liikidele, nagu seda on Kaug-Ida alatüüp. (Pletnev ja Men, 1998) Hetkel on Eestis kasutusel vaktsiinid, mis sisaldavad puukentsefaliidi viiruse inaktiveeritud tüvesid K231.2 (Encepur®) ja Neudörfl (TicoVac), mis on võrdlemisi efektiivsed. Siiski nõuab selline vaktsiin korduvsüste, ei pruugi koheselt tekitada täielikku immuunsust ning võib põhjustada soovimatuid kõrvaltoimeid, mistõttu on paremate ennetusravimite leidmine endiselt aktuaalne.

Langat viirus on hea ja võrdlemisi ohutu vahend mitte ainult puukentsefaliidi, aga ka teiste flaviviiruste elutsükli uurimistel, mistõttu otsustati antud bakalaureusetöös just seda kasutada. Joonisel 4 on välja toodud skeem eksperimentaalses osas kasutatavast Langat viiruse infektsioonilisest kloonist, mis on loodud professor Andres Meritsa poolt.



**Joonis 4.** Langat viiruse infektsioonilise klooni skeem pCCI vektoris (lineaarsel kujul). SP6 – viiruse genoomse RNA *in vitro* transkriptsiooniks vajaminev promooter, UTR – transleerimata regioon, C – nukleokapsiid, prM – membraani prekursor, E – ümbris, NS – mitte-struktuurne. Infektsioonilist klooni kodeeriv põhiplasmiid sisaldab ka klooramfenikooli resistentsusgeeni (oluline plasmidi paljundamisel), mida skeemi lihtsustamiseks pole näidatud.

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Langat viirus on vähe uuritud puukidega leviv viirus, mis kuulub flaviviiruste perekonda. Eelnevad uurimused on näidanud, et erinevalt Euroopa, Siberi ja Kaug-Ida alatüüpidest, ei põhjusta Langat viirus teadaolevalt inimestel entsefaliiti, mistõttu võib tema elutsükli uurimine olla kasulik potentsiaalsete uute ravimite ja vaktsiini väljatöötamisel või flaviviiruste elutsükli paremaks mõistmiseks.

Antud bakalaureusetöö eesmärgiks oli konstrueerida Langat viiruse replikaasi, polümeraasi ja nende vastavad negatiivsete kontrollide (inaktiveeritud polümeraasiga) ekspressioonikonstruktid ning hinnata loodud konstruktide õnnestumist iseloomustades nende ekspressiooni koekultuuris.

Nimetatud eesmärkide saavutamiseks:

1. Disainiti, kloneeriti ja paljundati Langat viiruse replikaasi, polümeraasi ning nende polümeraas-inaktiivsete kontrollide ekspressioonikonstruktid.
2. Uuriti ekspressiooni kasutades immunofluorestsents- ja western blot analüüsi.

### 2.2 Materjalid ja metoodika

#### 2.2.1 Plasmiidid

Antud töös kasutati kloneerimise matriitsidena ja vektoritena järgmisi plasmide:

- pCCI-LGTV. Professor Andres Meritsa poolt loodud Langat viiruse infektsiooniline kloon. Sisaldab bakterites paljundamiseks vajalikku klooramfenikooli selektsioonimarkerit.
- pCCI-CMV-DENV-Replikaas. Professor Andres Meritsa poolt loodud Dengue viiruse replikaasi ekspressioonikonstrukt, mis sisaldab kloneerimiseks vajaminevat CMV (*Cytomegalovirus*) varajast promooterit.
- pMC-gtGTU2-ZIKV-PL. Juhendaja poolt loodud konstrukt, mis sisaldab vajaminevat *flag tag*-i. Sisaldab bakterites paljundamiseks vajalikku kanamütsiini selektsioonimarkerit.

- Kommertsiaalne vektor pJet1.2-Blunt (CLONEJet, ThermoFischer). Vahepealne kloneerimisvektor, mis oli vajalik uuritavate järjestuste õigsuse kontrolliks sekveneerimise abil. Sisaldab ampitsilliini selektsioonimarkerit. (Lisa 1)
- Kommertsiaalne vektor pcDNA4/TO (Invitrogen, ThermoFischer). Imetajarakkude jaoks disainitud ekspressioonivektor. Sisaldab bakterites paljundamiseks vajalikku ampitsilliini selektsioonimarkerit. (Lisa 2)

### 2.2.2 Söötmed ja rakuliinid

Töö raames kasutati valmistatud plasmiidide paljundamiseks järgnevaid söötmeid:

- LB (*Lysogeny Broth*) – 1% trüptoon, 0.5% pärmiekstrakt, 1% NaCl
- SOY – 1.7 % trüptoon, 0.3% soytoon, 0.25% dekstroos, 0.5% NaCl, 0.25% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- SOC (*Super Optimal Broth with Catabolite repression*) – 0.5% pärmiekstrakt, 2% trüptoon, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glükoos

Koekultuurikatsetes kasutati U2OS (*human osteosarcoma*, inimese osteosarkoomi) rakke, mida kasvatati DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) söötmes, mis sisaldas 100 U/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini segu ning 10% FBS-i (*fetal bovine serum*, veiseloote seerum) 37°C ja 5% CO<sub>2</sub> juures.

### 2.2.3 Lahused ja puhvrid

Antud peatükis on välja toodud laborikaaslaste või töö autori poolt valmistatud lahused. Välja pole toodud komplektides olevaid lahuseid, kuna nende koostised pole tihti teada või on patenteeritud.

- SOLI – 50 mM glükoos, 25 mM TrisCl (*trisaminomethane chloride*, trisaminometaankloriid) (pH 8), 10 mM EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*, etüleendiamiintetraatsetaathape) (pH 8)
- SOLII – 0.2 M NaOH, 1% SDS (*sodium dodecyl sulfate*, naatrium dodetsüülsulfaat)
- SOLIII – 5 M kaaliumatsetaat, 0.115% veevaba äädikhape
- TAE – 40 mM Tris, 20 mM äädikhape, 1 mM EDTA



- Dulbecco PBS (DPBS) (*Dulbecco's phosphate buffered saline*, Dulbecco fosfaat-puhverdatud soolalahus) – 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.9 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>
- “Laemmli” lüüsipuhver – 50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 100 mM dithiothreitol, 2% SDS; 10% glütserool, 0.02% broomfenoolsinine
- Westerni pesupuhver – 50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% Tween20
- SDS jooksupuhver – 25 mM Tris, 0.25 M glütsiin, 0.1% SDS (pH 8.3)
- Poolkuiv (*semi-dry*) ülekandepuhver – 39 mM glütsiin, 48 mM Tris, 0.037% SDS, 20% metanool
- 5% FCS-DPBS (*fetal calf serum in Dulbecco PBS*, veiseloote seerum Dulbecco PBS-s)
- 3% BSA-westerni pesupuhver (*bovine serum albumin in western wash buffer*, veiseseerumi albumiin westerni pesulahuses)

#### 2.2.4 PCR, geelelektroforees ja geelist puhastamine

Töös vajaminevaid fragmente amplifitseeriti kasudes polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR). Selleks segati jää peal kokku iga fragmendi jaoks 20 µl reaktsioonisegu, mis sisaldas järgmisi komponente: matriits-DNA (10 ng), otse- ja pöördpraimereid (0.5 µM), 5x Phusion *High-Fidelity* puhvrit (ThermoFischer), dNTP-de segu (0.2 mM), Phusion DNA polümeraasi (0.4-1 ühikut) (laboris toodetud) ning deioniseeritud vee (Braun) abil viidi reaktsioonisegu maht 20 µl-ni. Kasutatud matriitsid ja nende vastavad praimerid on täpsemalt välja toodud tabelis 1 ning kasutatud PCR programm tabelis 2. Praimerite nukleotiidne järjestus on välja toodud Lisas 3.

**Tabel 1.** PCR reaktsioonisegus kasutatud matriits-DNA-d ja neile vastavad praimerid.

Matriits-DNA	Otsepraimer	Pöördpraimer
pCCI-CMV-DENV-Replikaas	CMV_Pme_F	CMV_Env_R
pCCI-LGTV	Env_CMV_F	NS1_Avr_R
pCCI-LGTV	BstBI_NS5_F	SwaI_NS5_R
pCCI-LGTV	NS5_Avr_F	NS5_AfeI_R

**Tabel 2.** Kasutatud PCR programm

98°C	2 min	1 tsükel
98°C	10 s	5 tsüklit
55°C	30 s	
72°C	1 min 1000 ap kohta	
98°C	10 s	30 tsüklit
65°C	30 s	
72°C	1 min 1000 ap kohta	
72°C	10 min	1 tsükel

Saadud PCR reaktsioonisegus hävitati metüleeritud DNA (plasmiidne matriits) lisades 0.5 µl DpnI (FastDigest, ThermoFischer) restriksiooniensüümi ning inkubeerides 37°C juures ~1 h. Õigete fragmentide olemasolu kontrolliti agarosgeelelektroforeesil. Selleks lisati segudele juurde 10-kordset *Green Buffer*'it (ThermoFischer) ning kanti nad 1.2% agarosgeelile. Geeli jooksutati TAE puhvris. Kui õige suurusega fragmendid olid olemas, lõigati nad skalpelliga geelist välja ning puhastati kasutades *Zymoclean™ Gel DNA Recovery* komplekti (Zymo Research) järgides tootjapoolset juhendit. Lühidalt, geeli tükk sulatati vastavas komplekti lahuses 50°C juures, kanti DNA-d siduvale kolonnile, tsentrifuugiti ning kolonn pesti kaks korda vastava pesulahusega. Lõpuks elueeriti DNA vees (Braun).

### 2.2.5 SPLICE-PCR

SPLICE-PCR eesmärk on omavahel siduda kaks DNA fragmenti. Selleks amplifitseeritakse esmalt kokkuviidavad fragmendid eraldi, et tekitada komplementaarsed üleulatuvad otsad, mille järel lisatakse mõlemad fragmendid ühte PCR reaktsioonisegusse ekvimolekulaarses suhtes. Need fragmendid toimivad üksteise jaoks praimeritena. Pärast paari tsüklit lisakse kummagi fragmendi otsa praimerid. See on vajalik selleks, et saadud kokkuseotud lõpp-produkti amplifitseerida.

Antud katses segati reaktsioonisegu kokku jääl ning see koosnes kahest matriits DNA-st, mis saadi eelmises peatükis (2.2.4, lk 17). Matriits-DNA-sid lisati ekvimolekulaarses suhtes 1:1, 10-12.6 ng. Lisati ka 4 µl Phusion 5x *High-Fidelity* puhvrit (ThermoFischer), dNTP-sid (0.2 mM), 1 µl Phusion polümeraasi (toodetud laboris) ning maht viidi 20 µl-ni kasutades deioniseeritud vett (Braun). Esialgu primereid ei lisatud, need lisati PCR programmi (tabel 3)

viienda tsükli käigus. Amplifitseerimiseks kasutatud praimerid olid CMV\_Pme\_F ja NS1\_Avr\_R.

**Tabel 3.** Kasutatud SPLICE-PCR programm

98°C	2 min	1 tsükkel
98°C	10 s	5 tsüklit
55°C	30 s	
72°C	1 min 1000 ap kohta	
98°C	10 s	30 tsüklit
65°C	30 s	
72°C	1 min 1000 ap kohta	
72°C	10 min	1 tsükkel

Ka siin kontrolliti õige fragmendi olemasolu agarosgeelelektroforeesi abil nagu kirjeldatud punktis 2.2.4 (lk 18). Seekord kasutati kontrollimiseks ainult 5 µl PCR segust. Kui õige fragment oli olemas, puhastati ülejäänud segu kolonnpuhatusmeetodil kasutades Zymo Research *DNA Clean & Concentration* komplekti. PCR segu tsentrifuugiti läbi komplektis oleva DNA-d siduva kolonni, kolonni filter pesti sobivate lahustega läbi ning lõpuks elueeriti DNA vees. (Braun)

### 2.2.6 Ligatsioon pJet1.2 vektorisse

Kui kõik PCR produktid olid olemas, ligeeriti nad pJet1.2-Blunt (CLONEJet, ThermoFischer) vektorisse jälgides tootja poolt antud protokoll. PCR produkti võeti vastavalt fragmendi pikkusele ehk siis 75-125 ng, pJet1.2-Blunt vektorit võeti 50 ng, T4 ligaasi (CLONEJet, ThermoFischer) lisati 1 ühikut (1 µl) ning 2x reaktsioonipuhvrit (CLONEJet, ThermoFischer) lisati 10 µl. Vee abil viidi reaktsioonisegu maht 20 µl-ni. Seejärel inkubeeriti segusid toatemperatuuril umbes tund aega.

### 2.2.7 XL-10 rakkude transformatsioon kuumašoki meetodil

Pärast ligatsiooni viidi plasmiidse DNA paljundamiseks läbi XL-10 (*E. coli*) kompetentsete rakkude transformatsioon. Selleks sulatati rakud (umbes 200 µl) esmalt jääl üles, lisati juurde

10 µl ligatsioonisegu ning jäeti 30 minutiks jää peale. Seejärel viidi läbi kuumašokk, et plasmiidne DNA saaks bakterirakkudesse siseneda. Rakud koos ligatsioonisega pandi 42°C juurde kaheks minutiks ning seejärel asetati tagasi jääle veel kaheks minutiks. Siis lisati 800 µl SOC söödet ning asetati loksutule umbes 45 minutiks 37°C juurde. Lõpuks plaaditi rakud 100 µg/ml ampitsilliini sisaldavale tardsöötmele ning inkubeeriti 37°C juures ~16 tundi.

### **2.2.8 pJet1.2-Blunt vektori plasmiidse DNA paljundamine minipreparatsioonmeetodil, restriksioonanalüüs ja sekveneerimine**

Igalt tassilt külvati 4-6 kolooniat 3 ml LB söötmesse, mis sisaldas 100 µg/ml ampitsilliini. Seejärel asetati nad loksutisse (37°C, 220 pööret minutis) umbes 16 tunniks kasvama.

Plasmiidse DNA eraldamiseks bakterirakkudest kasutati minipreparatsioon-puhastust, mis põhineb aluselise lüüsi meetodil. Selleks kasutati *Plasmid DNA Extraction Mini* komplekti (Favorgen). Rakkudelt eemaldati sööde tsentrifuugimise teel, seejärel rakud resuspendeeriti, lüüsi, lüsaat neutraliseeriti ning plasmiidne DNA puhastati kolonn-puhastus meetodil. Lõpuks elueeriti DNA vees.

Puhastatud minipreparatsioonid kontrolliti kasutades restriksioonanalüüsi. Proove kontrolliti samade restriктаasidega, mida sooviti kasutada hiljem kloneerimiseks (välja toodud peatükis 2.3.1, joonistel 10 ja 11, lk 31-33). Restriksioonisegusse lisati plasmiidne DNA (~300-500 ng), 0.2 µl restriктаasi (FastDigest, ThermoFischer), 1.5 µl 10x *Green Buffer* (FastDigest, ThermoFischer) ning deioniseeritud vee (Braun) abil viidi maht 15 µl-ni. Restriksioonsegusid inkubeeriti 37°C juures 45 minutit.

Seejärel jookutati restriksioonisegusid 0.8% agarosgeelil 1x TAE puhvris geelelektroforees meetodil sobiva voltaaži juures (10 V/cm), kuni oli näha, et fragmendid on üksteisest piisavalt eraldunud, markerina kasutati O'GeneRuler 1kb *DNA Ladder*'it. (ThermoFischer) Restriksioonanalüüsi tulemuse põhjal valiti iga konstrukti puhul kaks kloon, mis saadeti edasi sekveneerimisele, et kontrollida DNA järjestuste õigsust.

### **2.2.9 PCR-mutagenees**

NS5 polümeraasi inaktiveeriv mutatsioon viidi kodeerivasse järjestusesse kasutades PCR-mutageneesi. Nii otse-, kui pöördkomplementaarset regiooni omavad praimerid sisaldasid

soovitud mutatsioonikohta. Nad seonduvad kummalegi poole mutatsioonikohta ning hakkavad liikuma üksteisele vastu, sünteesides täispika lineaarse plasmidi järjestuse, mis sisaldab “kleepuvate” ehk üleulatuvate otstega soovitud mutatsiooni. Sellise “kleepuvate” otstega lineaarse plasmidse DNA-ga transformeeritud kompetentsete bakterirakkude sees toimub bakteri-sisese mehhanismi abil DNA reparatsioon, mille tõttu moodustub meile vajalik tsirkulaarne plasmiidne DNA soovitud mutatsiooniga.

Reaktsioonisegu segati kokku jääl; see sisaldas matriits-DNA-d ~10 ng, juurde lisati dNTP-sid (lõppmahus 0.2 mM), 5x Phusion *High-Fidelity* puhvrit (4 µl), Phusion polümeraasi (0.4 µl), otsepraimerit (lõppmahus 0.5 µM) ning pöördpraimerit (lõppmahus 0.5 µM). Deioniseeritud vee (Braun) abil viidi maht 20 µl-ni. Tabelis nr 4 on välja toodud kasutatud PCR programm.

Otsepraimer: GAA\_F GTGAGCGGTGCCGCCTGTGTGGTCAGGCCAGTGGATGAC

Pöördpraimer: GAA\_R CCACACAGGCGGCACCGCTCACCAGCATTCTGCTCAGC

Punasega on märgitud mutatsioonikohad, joonega on märgitud GAA motiivi järjestus.

**Tabel 4.** Kasutatud PCR-mutageneesi programm

98°C	2 min	1 tsükel
98°C	10 sek	5 tsüklit
55°C	30 sek	
72°C	2 min 30 sek	
98°C	10 sek	22 tsüklit
65°C	30 sek	

Et paljundada saadud konstrukti, viidi läbi XL-10 (*E. coli*) kompetentsete rakkude transformatsioon kuumasoki meetodil nagu juba kirjeldatud punktis 2.2.7 (lk 19-20) ning saadud kolooniaid propageeriti nagu kirjeldatud punktis 2.2.8 (lk 20). Puhastatud plasmidset DNA-d kontrolliti restriksiooni abil. Umbes 300 ng DNA-le lisati juurde 0.2 µl Bsp119I ja 0.2 µl SmaI restriктаase (FastDigest, ThermoFischer). GDD → GAA mutatsiooni olemasolu kontrolliti sekveneerimisel.

### 2.2.10 Kloneerimine

Soovitud ekspressioonikonstruktide saamiseks oli vaja viia läbi kolmeastmeline kloneerimine, et aga kõikides astmetes olid tehtavad sammud (restriksioon, ligatsioon, transformatsioon) sarnased, kehtivad järgnevalt kirjeldatud katsed igas astmes tehtud kloneerimisele.

#### ***Restriksioon ja geelist puhastamine***

Et viia omavahel kokku sisseviidav fragment ehk insert ja plasmiid, millesse insert sisestatakse ehk vektor, on esmalt vaja mõlemad jupid originaalvektorist välja lõigata vastavate restriктаaside abil ja puhastada. Restriksioonisegu sisaldas 1.5-3 µg plasmidi, millest saadi insert või vektor, 1-1.5 µl vastavat restriктаasi (olenevalt plasmidi kogusest) (FastDigest, ThermoFischer), 10x *Green Buffer*'it (ThermoFischer) ning deioniseeritud vee (Braun) abil viidi maht selliseks, et nimetatud 10x *Green Buffer* oleks ühekordne. Kasutatud restriктаase on täpsustatud tulemuste peatükis 2.3.1, tabelites 5, 6 ja 7, lk 34-39. Restriksioonisegusid inkubeeriti 37°C juures 30-60 minutit. Ühel juhul oli vaja inserti selles sammus töödelda ka Klenowi fragmendiga (ThermoFischer), et muuta lõikamisel saadud üleulatu DNA ots "tõmbiks". Selleks lisati vastavale restriksioonisegule 3 ühikut (0.3 µl) Klenowi fragmenti (ThermoFischer) ja dNTP-de segu (lõppkontsentratsioon 0.25 mM). Vektori lõikamisel töödeldi seda umbes 15-30 minutit enne inkubatsiooni lõppu aluselise fosfataasiga (FastAP, ThermoFischer), eemaldades 5' fosfaatrühmad ning vältides seeläbi vektori iseeneslikku kokkuligeerumist. FastAP-i lisati vastavuses plasmidse DNA kogusega ehk näiteks 3 µg DNA-le lisati 3 ühikut (3 µl) FastAP-i. Fosfataas inaktiveeriti enne geelile kandmist 75°C juures 5-10 minutit. Lõigatud plasmiidid lahutati 1x TAE puhvril 0.8% agarosgeelil sobiva voltaaži (10 V/cm) ja aja juures; fragmentide suuruse hindamiseks kasutati markerina O'GeneRuler 1kb *DNA Ladder*'it. (ThermoFischer) Õige suurusega fragmendid lõigati geelist skalpelli abil välja ning puhastati kasutades Zymoclean™ *Gel DNA Recovery* komplekti (Zymo Research) nagu kirjeldatud punktis 2.2.4 (lk 18)

#### ***Ligatsioon***

Et viia insert vektori sisse, viidi läbi ligatsioon. Inserti ja vektori vahekord ligatsioonisegus otsustati selle põhjal, millised olid inserti ja vektori otsad. Et üleulatuivad ("kleepuvad") otsad

soodustavad seondumist tänu tekkivatele vesiniksidemete nukleotiidide vahel, võib sellisel juhul võtta inserti vähem. Kui on aga tegu “tõmpide” otstega ligeerimisega, on mõistlik võtta inserti suures ülehulgas, et suurendada otste kokkusattumise tõenäosust. Antud töös esinesid kõik kolm juhtu ning täpsed kasutatud ekvimolekulaarsed suhted on välja toodud järgnevalt:

- Vektori ja inserti mõlemad otsad on “kleepuvad” → 2:1 inserti kasuks
- Vektori ja inserti üks ots on “kleepuv”, teine “tõmp” → 3:1 inserti kasuks
- Vektori ja inserti mõlemad otsad on “tõmbid” → 6:1 inserti kasuks

Ligatsioonisegu maht oli 20 µl sisaldades sobivas koguses vektorit (100-200 ng), inserti (kogus arvutatud vastavalt vektori pikkusele ja soovitud suhtele) 4 µl 5x reaktsioonipuhvrit (Invitrogen), 0.5 µl T4 ligaas (Invitrogen) ning deioniseeritud vett (Braun) mahu täitmiseks. Igale ligatsioonisegule valmistati ka vastav kontrollsegu, et hinnata vektori enda kokkuligeerumise tõenäosust. Kontrollsegu komponendid olid samad, mis ligatsioonilgi, erinevusega, et inserti asemel lisati vastavas koguses vett. Ligatsioonisegusid inkubeeriti 12°C juures üleöö.

### ***Transformatsioon***

Enne igat järgmist astet oli tarvis hinnata ligatsiooni õnnestumise efektiivsust ning igat saadud konstrukti juurde paljundada. Selleks transformeeriti kompetentseid *E. coli* baktereid. Kõrge koopiaarvuga plasmiidide (pcDNA, pMC) puhul kasutati XL-10 ning madala koopiaarvuga (pCCI-BAC) puhul EPI300 kompetentseid rakke. Mõlemal juhul viidi transformatsioon läbi kuumašoki meetodil nagu kirjeldatud punktis 2.2.7 (lk 19-20). EPI300 rakkude puhul viidi transformatsiooni-järgne inkubatsioon loksutil (37°C, 220 pööret minutis), et saavutada parem aeratsioon ning seeläbi suurem transformatsiooni efektiivsus. Vastavalt plasmiidis asuvale antibiootikumiresistentuse geenile plaaditi transformatsioonisegud agari-tassidele, mis sisaldasid 100 µg/ml ampitsilliini (pcDNA), 25 µg/ml kanamütsiini (pMC) või siis SOY-söötme tassidele, mis sisaldasid klooramfenikooli kontsentratsioonis 12.5 µg/ml (pCCI-BAC). Kõiki tasse kasvatati 16-18 tundi 37°C juures.

### ***Minipreparatsioon ja indutseeritud minipreparatsioon***

Sarnaselt bakterite transformatsioonile, sõltus ka minipreparatsiooniks kasutatavad söötmed ja antibiootikumid põhi-plasmiidist. Nii pMC kui ka pcDNA põhjal olevate konstruktide

propageerimiseks kasutati LB (3 ml koloonia kohta) söödet, millesse pcDNA korral lisati ampitsilliini (100 µg/ml) ning pMC korral kanamütsiini (25 µg/ml). pCCI-BAC vektori korral kasutati SOY (2.5 ml koloonia kohta) söödet, millesse lisati 12.5 µg/ml klooramfenikooli. Minipreparatsioone kasvatati ja puhastati nagu juba kirjeldatud punktis 2.2.8 (lk 20).

Madala koopiaarvuga pCCI vektori korral viidi parema plasmiidse DNA kvaliteedi/kontsentratsiooni saamiseks läbi indutseeritud minipreparatsioon. Esialgu külvati üksikkolooniad 12.5 µg/ml klooramfenikooli sisaldavasse 10 ml SOY söötme sisse ning inkubeeriti 16 tundi loksutil (37°C, 220 pööret minutis). Seejärel indutseeriti neid, lisades juurde 40 ml SOY 12.5 µg/ml klooramfenikooliga söödet, mis sisaldas ka L-arabinoosi (VWR Life Science) kontsentratsiooniga 0.1% (lõppmahus 50 ml). Bakterite vedelkultuurid asetati veel viieks tunniks loksutisse (37°C, 220 pööret minutis) ning puhastati pärast seda kasutades topelt-puhastusprotokolli. Topelt-puhastusmeetodil koguti esmalt rakud tsentrifuugimise teel ning eemaldati sööde. Seejärel resuspendeeriti rakud SOLI lahuses, lüüsi 5 minutit toatemperatuuril SOLII lahuses ning inkubatsiooniaja lõppedes lüüsilahus neutraliseeriti kasutades SOLIII lahust. Seejärel tsentrifuugiti rakujääkide mass põhja (sel puhul plasmiidne DNA jääb lahusesse): saadud lahus filtreeriti läbi peenekoelise riide uude tuubi ning lisati juurde isopropanooli (~0.6 osa lahuse mahust). Saadud lahusest sadestati DNA +4°C juures 30 minutit tsentrifuugides (3200× g). Pärast seda eemaldati vedelik täielikult ning edasi jälgiti komertsiaalset minipreparatsiooni puhastusprotokolli, mida on juba kirjeldatud punktis 2.2.8 (lk 20). Puhastatud minipreparatsioonide DNA kontsentratsioone mõõdeti NanoDrop™ spektrofotomeetriga.

Minipreparatsiooniks kasutatavate kolooniate arv sõltus ligatsiooni ja kontrolli transformatsioonitassidel olevate kolooniate vahekorra. Suur kolooniate arv kontrolltassil viitas suurele kogusele kokkuligeerunud vektoritele, mistõttu oli sellisel juhul vaja võtta rohkem proove minipreparatsiooniks. Nii suurendati tõenäosust, et võetud minipreparatsioonide seas oli mõni konstrukt, millesse siiski oli insert sisenenud. Rohkem proove oli vaja võtta ka juhul, kui oli tegemist tõmpide otstega kloneerimisega, kuna insert võib sellisel juhul olla sisenenud nii õiges kui ka vales orientatsioonis.

#### **2.2.11 Midipreparatsioon pcDNA vektori põhjal konstruktide jaoks**

Et saada suuremas koguses plasmiidset DNA-d (loomsetes rakkudes katsete teostamiseks), viidi kõrge koopiaarvuga pcDNA vektori jaoks läbi midipreparatsioon *E. coli* XL-10



bakterirakkudest. Üksikkoloonia külvati 100 ml LB söötmesse, mis sisaldas 100 µg/ml ampitsilliini ning kasvatati 16 tundi loksutil (220 pööret minutis, 37°C). Edasi eemaldati sööde tsentrifuugimise teel ning plasmiidne DNA puhastati rakkudest kasutades Macherey-Nagel endotoksiini vaba *Nucleobond™ Xtra Midi EF* komplekti. Rakud resuspendeeriti sobivas lahuses, lüüsi toatemperatuuril 5 minutit ning seejärel lüsaat neutraliseeriti. Neutraliseeritud lüsaati inkubeeriti 5 minutit jääl ning et eraldada rakumass supernatandist, mis sisaldas soovitud plasmiidset DNA-d, tsentrifuugiti proove 10 minutit (vähemalt 5000x g). Edasi kanti supernatant NucleoBond® Xtra kolonni ning oodati kuni kogu vedelik gravitatsioonijõul läbi filtri kandub, vedelikus sisalduv DNA jäi aga filtrisse kinni. Pärast mitmekordset pesu, DNA elueeriti filtrist endotoksiinivabas vees.

### **2.2.12 Indutseeritud maxipreparatsioon pCCI-BAC vektori põhjal konstruktide jaoks**

Esialgu külvati üksik koloonia 600 ml 12.5 µg/ml klooramfenikooli sisaldavasse SOY söötme sisse. Külve kasvatati loksutil ~16 tundi (220 pööret minutis, 37°C). Et kultuuri indutseerida, lisati pärast inkubatsiooni juurde 2.4 liitrit SOY söödet, mis sisaldas 12.5 µg/ml klooramfenikooli ja 0.1% lõppkontsentratsiooniga L-arabinoosi (arvestades lõppmahtu 3 liitrit) (VWR Life Science). Seejärel inkubeeriti bakteri vedelkultuure loksutil 37°C juures veel 5 tundi. Aja möödudes bakterikultuur koguti tsentrifuugimise teel, eemaldati sööde ning puhastati kasutades topelt-puhastusmeetodit nagu juba kirjeldatud punktis 2.2.10 (*“Indutseeritud minipreparatsioon”*, lk 23-24). Kommertsiaalse minipreparatsiooni komplekti asemel kasutati Macherey-Nagel endotoksiini vaba *Nucleobond™ Xtra Maxi EF* komplekti ning sellega puhastamine käis samal põhimõttel nagu punktis 2.2.11 (lk 24-25).

### **2.2.13 U2OS rakkude transfektsioon**

Transfektsioonile eelneval päeval külvati rakud 60 mm tassile, mis sisaldas 3-4 katteklaasi. Järgmisel päeval oli rakkude konfluentsus nii katteklaasidel kui ka tassil endal saavutanud 85-90%, mis oli transfektsiooniks piisav. U2OS rakke transfekteeeriti Lipofectamine Plus (ThermoFischer) komplektiga jälgides tootja poolt antud juhendit ning soovitatud koguseid. 4 µg vastavat plasmiidset DNA-d segati kokku 392 µl OPTI-MEM (ThermoFischer) söötmega ja 4 µl Plus reagentiga. Paralleelselt segati teises tuubis kokku ka 336 µl OPTI-MEM söödet ja 9 µl LTX reagenti. Seejärel segati kokku 1:1 suhetele DNA-Plus-OPTI-MEM ja LTX-OPTI-

MEM segud ning inkubeeriti toatemperatuuri 5 minutit, mille jooksul moodustub DNA-LTX-Plus kompleks. Selle aja jooksul vahetati rakkudel vana sööde uue vastu ning lisati kogu moodustunud LTX-DNA kompleks. Transfektsiooni efektiivsuse hindamiseks valmistati positiivne kontroll EGFP-d (*enhanced green fluorescent protein*, võimendatud roheliselt fluorestseeruvat valku) ekspresseriva plasmidi abil (pEGFP-N1, Clontech). Rakke inkubeeriti 37°C ja 5% CO<sub>2</sub> juures 48 tundi.

#### 2.2.14 Immunofluorestantsanalüüs

48 h pärast transfektsiooni aspireeriti sööde ja katteklaasidel kasvanud rakud pesti kaks korda Dulbecco PBS-ga. Seejärel fikseeriti rakud 4% paraformaldehüüdiga DPBS-is 15 minutit (toatemperatuuril), mille järel permeabiliseeriti metanooliga -20°C juures 10 minutit. Inkubatsiooni lõppedes aspireeriti metanool ning klaasidel olevatel rakkudel lasti õhu käes täielikult kuivada. Seejärel pesti nad veel kolm korda Dulbecco PBS-ga üle. Rakud blokiti 5% FCS-DPBS-iga 30 minutit toatemperatuuril. Inkubatsiooniperioodi ajal lahjendati antikehad samas blokkilahuses. Primaarsete antikehadena kasutati meie Rootsi kolleegidelt UMEÅ Ülikoolist saadud anti-TBEV-NS5 (1:1000, toodetud kanas) ja anti-TBEV-NS3 (1:500, toodetud kanas) antikehi, aga ka anti-*flag* antikeha (1:500, toodetud hiires) (anti-DDDDK tag, Abcam). Sekundaarsete antikehadena kasutati kana Immunoglobuliin Y (IgY) vastane Dylight549-konjugeeritud (1:500, toodetud küülikus) (Icosagen) ning hiire IgG vastane AlexaFluor568 konjugeeritud (1:500, toodetud kitses) (Invitrogen). Täpsed konstruktidele vastavad primaarsed ja sekundaarsed antikehad koos lahjendustega on välja toodud ka tulemuste peatükis 2.3.2 tabelis 8 (lk 41). Pärast blokkimist kanti klaasidele peale primaarsed antikehad ning inkubeeriti tund aega. Siis pesti rakud kolm korda Dulbecco PBS-iga läbi ning lisati sekundaarsed antikehad, mis olid samuti lahjendatud blokk-lahuses. Seejärel inkubeeriti klaase veel tund aega pimedas. Lõpuks pesti neid uuesti kolm korda Dulbecco PBS-iga ja seejärel veel kaks korda deioniseeritud veega (Braun). Klaasidel lasti õhu käes kuivada ja asetati siis alusklaasile, millel asus 3 µl SlowFade pleekimisvastast reagenti (ThermoFischer), millesse oli tuumade värvimiseks lisatud 0.5 µg/ml DAPI-t (4',6-diamidino-2-fenüülindool), rakukiht allpool. Pärast üleöö +4°C juures kuivamist vaadeldi preparaate Carl Zeiss LSM 710 konfokaalmikroskoobiga.

## 2.2.15 Western blot

60 mm tassidel 48 tundi kasvanud transfekteeeritud rakkudelt eemaldati sööde, pesti Dulbecco PBS-ga ning lüüsiiti seejärel kasutades 150 µl 2x Laemmli lüüsipuhvrit. Lüüsitud rakumass koguti tuubi ja inkubeeriti 100°C juures 10 minutit, et denatureerida valgud. Seejärel kanti rakulüsaat 10%-lisele SDS-polüakrüülamiidgeelile (SDS-PAAG) ja lahutati SDS-jooksupuhvris 100-180 V juures umbes poolteist tundi kuni Laemmli puhvris olev broomfenoolsinine ehk “front” oli jõudnud geeli täiesti lõppu välja. Et kanda valgud geelilt üle nitrotselluloosmembraanile (GE Healthcare) asetati geel membraani ja kolmekordse Whatman filterpaberi vahele, mida eelnevalt leotati poolkuivas (*semi-dry*) puhvris ning kanti üle 20 V voolu toimetund aega kasutades *Trans-Blot Semi-Dry* masinat (Bio-Rad). Et vältida antikehade ebaspetsiifilist seondumist membraanile, blokiti membraani pool tundi 5% lõssipulber-western blot pesupuhvris. Lõssipulbrilahus pesti maha loksutades membraani 3x 5 min western blot pesupuhvris. Huvipakkuvate valkude avaldamiseks töödeldi nitrotselluloosmembraani loksutil üleöö (+4 °C) spetsiifiliste primaarse antikehadega, mida lahjendati 3% BSA-western blot pesupuhvris. Valkude detekteerimiseks kasutati Rootsi kolleegidelt UMEÅ Ülikoolist saadud anti-TBEV-NS3 (1:1500, toodetud kanas) ning anti-TBEV-NS5 (1:1500, toodetud kanas) primaarseid antikehi. Samuti kasutati ka olemasolevat anti-*flag* (1:1000, toodetud hiires) (anti-DDDDK tag, Abcam) primaarset antikeha. Täpsed konstruktidele vastavad primaarsed ja sekundaarsed antikehad koos lahjendustega on välja toodud tulemuste peatükis 2.3.3 tabelis 9 (lk 43). Järgmisel päeval eemaldati membraanilt primaarse antikeha lahus, pesti 3x 10 min westerni pesupuhvriga ning lisati sekundaarne antikeha. Sekundaarsete antikehadena kasutati 3% BSA-westerni pesupuhvris lahjendatud kana IgY vastast HRP-ga (*horseradish peroxidase*, mädarõika peroksüdaas) konjugeeritud antikeha (1:5000) (Icosagen AS) ja hiire IgG vastast HRP-ga konjugeeritud antikeha (1:10 000) (LabAS Ltd). Membraani inkubeeriti toatemperatuuril loksutil tund aega. Edasi eemaldati sekundaarne antikeha ning taaskord pesti membraan 3x 10 min westerni pesupuhvriga. Valgud detekteeriti ja ilmutati kasutades *SuperSignal™ West Femto* ülitundlikke reagentide (ThermoFischer). Lahused “*Stable Peroxide Buffer*” ja “*Luminol Enhancer*” segati kokku suhtes 1:1, lisati membraanidele ja inkubeeriti 1 minut. Membraani eksponeeriti röntgenfilmidele eri aegadel (3 s kuni 5 min), et leida kõige optimaalsem signaali tugevus.

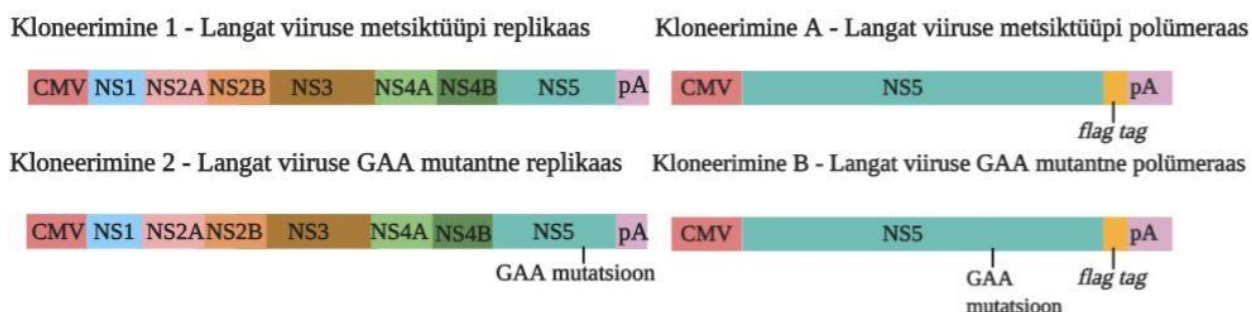
## 2.3 Tulemused ja arutelu

Langat viirus on kasulik ja inimesele ohutu mudel puuk-entsefaliidiviiruste elutsükli uurimiseks. Antud töö raames sooviti konstrueerida tema replikaasi ja polümeraasi ekspressioonikonstruktid, konstruktidele vastavad negatiivsed kontrollid ning ühtlasi ka uurida nende õnnestumist koekultuuris.

### 2.3.1 Kloneerimine

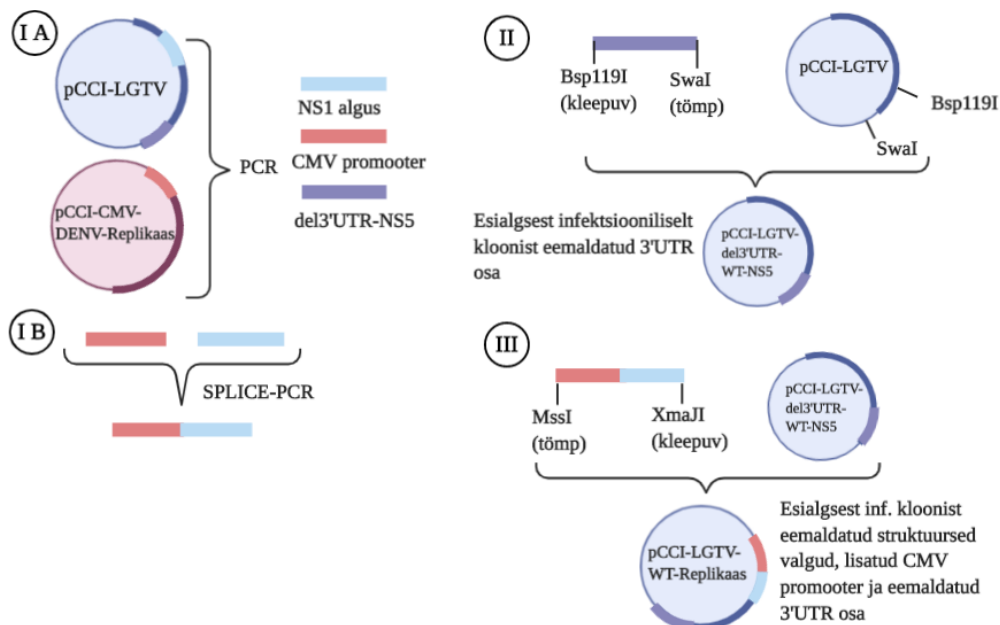
Kõiki loodud konstrukte valmistati paralleelselt ning kloneerimisplaani võib üldises mõistes jagada neljaks etapiks, mida edaspidi tähistame lihtsustamise mõttes I (A, B, C), II, III ja IV astmena. Need etapid on selliselt tähistatud ka kloneerimisskeemidel. (Joonised 6, 7, 8 ja 9) Soovitud konstruktide (kokkuvõttev skeem joonisel 5) kloneerimist aga tähistame järgmiselt:

- Kloneerimine 1 (joonis 5 ja 6) – eesmärgiks saada CMV promooteri kontrolli alt metsiktüüpi Langat viiruse replikaasi ehk NS1-NS5 polüproteiini kodeeriv järjestus.
- Kloneerimine 2 (joonis 5 ja 7) – eesmärgiks saada CMV promooteri kontrolli alt NS5 valgus asetseva GDD → GAA mutatsiooniga Langat viiruse replikaasi kodeeriv järjestus.
- Kloneerimine A (joonis 5 ja 8) – eesmärgiks saada Langat viiruse metsiktüüpi polümeraasi ehk NS5 valgu kodeeriv järjestus eukariootses ekspressioonivektoris.
- Kloneerimine B (joonis 5 ja 9) – eesmärgiks saada NS5 valgus asetseva GDD → GAA mutatsiooniga Langat viiruse polümeraasi kodeeriv järjestus eukariootses ekspressioonivektoris.



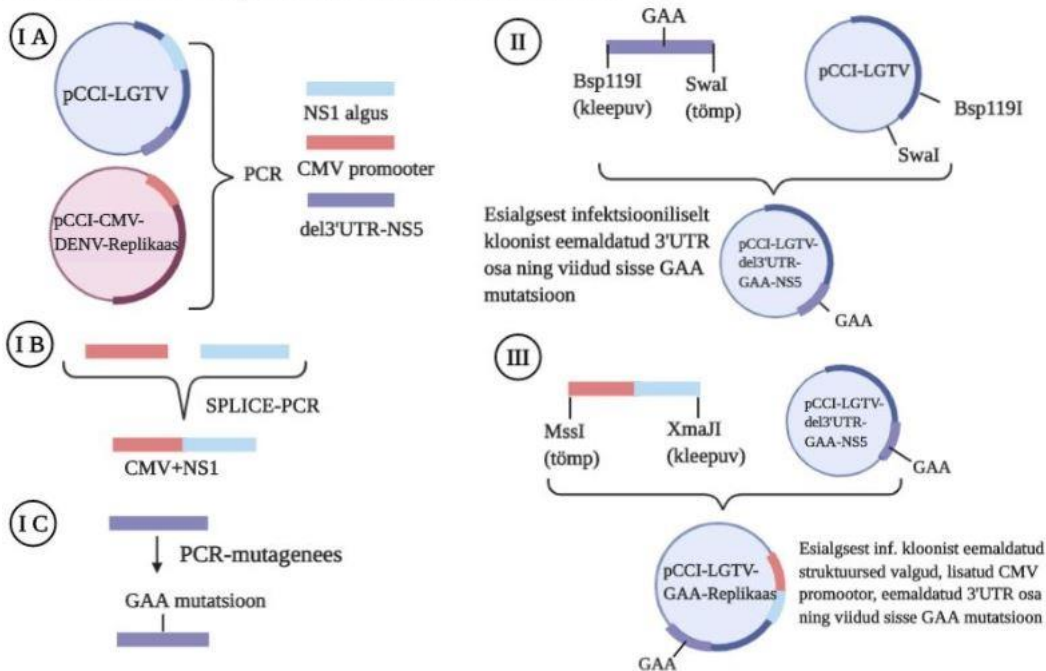
**Joonis 5.** Kokkuvõttev skeem soovitud konstruktide ülesehitusest. (Lineaarsel kujul) CMV - Cytomegaloviiruse promooter, NS – mitte struktuurset valku kodeeriv järjestus, pA – polüadenüleeritud regioon

### Kloneerimine 1 - Langat viiruse metsiktüüpi replikaas



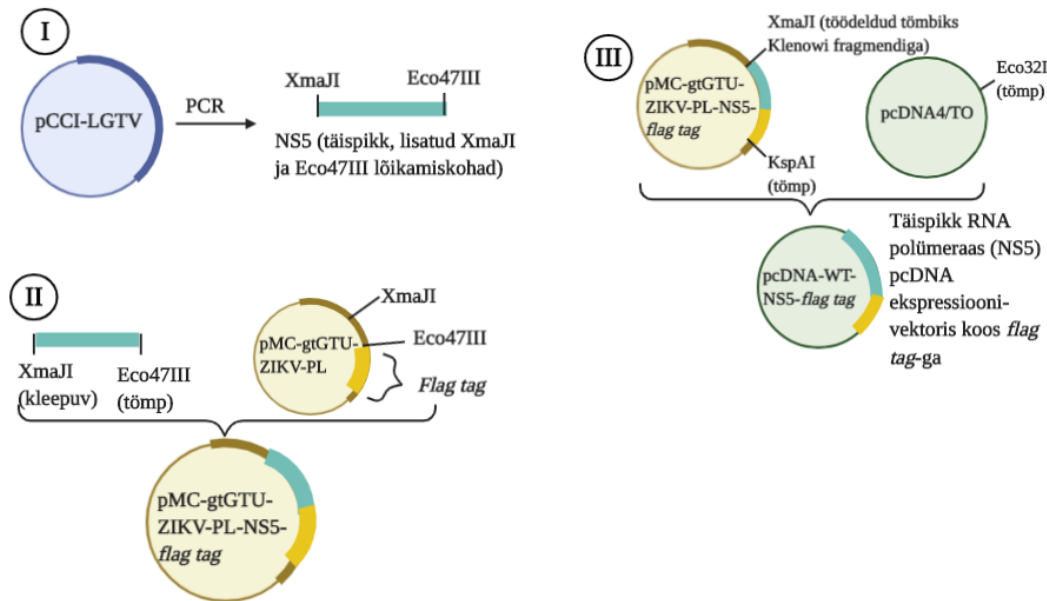
**Joonis 6.** Illustratsioon kloneerimisest 1. **(I A)** PCR meetodi abil amplifitseeriti esialgselt Langat viiruse infektsioonilisest kloonist NS1 algus, NS5 lõpp (del3'UTR-NS5) ning Dengue viiruse replikaasi konstrukti CMV promootor. **(I B)** SPLICE-PCR abil viidi omavahel kokku CMV promootor ja NS1 algus, eemaldades selliselt viiruse struktuurseid valke kodeerivad järjestused. **(II)** Punktis I A saadud amplifitseeritud NS5 lõpp kloneeriti tagasi esialgsesse infektsioonilisse kloonis, eemaldades selliselt 3'UTR osa. **(III)** Punktis I B amplifitseeritud CMV-NS1 järjestus kloneeriti punktis II saadud konstrukti eemaldades selliselt sealt struktuursed valgud ja lisades CMV promootori.

### Kloneerimine 2 - Langat viiruse GAA mutantne replikaas



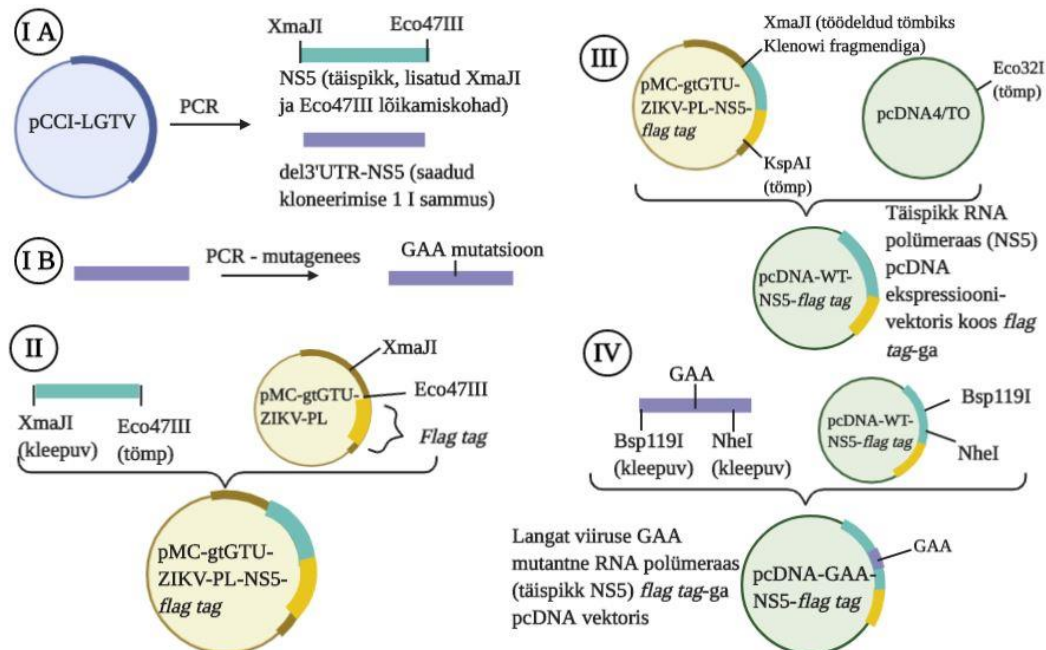
**Joonis 7.** Illustratsioon kloneerimisest 2. Kloneerimispehimõte on sama nagu metsiktüvelgi (joonis 6), erinevusega, et del3'UTR-NS5 asemel viiakse esialgsesse kloonis punktis I C saadud PCR-mutageneesi abil valmistatud GAA mutatsiooniga fragment.

### Kloneerimine A - Langat viiruse metsiktüüpi polümeraas



**Joonis 8.** Illustratsioon kloneerimisest A. **(I)** Esmalt amplifitseeriti NS5 valku kodeeriv täispikk järjestus ning ühtlasi lisati praimerite abil XmaJI ja Eco47III lõikamiskohad. **(II)** Seejärel viidi ta pMC-gtGTU-ZIKV-PL plasmidi, et lisada *flag tag*, mille abil oli võimalik hiljem detekteerida ekspressiooni toimumist eukariootsetes rakkudes. **(III)** Edasi viidi NS5 koos *flag tag*-iga pcDNA4/TO imetajarakkude ekspressioonivektoris.

### Kloneerimine B - Langat viiruse GAA mutantne polümeraas



**Joonis 9.** Illustratsioon kloneerimisest B. **(I A)** PCR meetodil amplifitseeritakse täispikk NS5 kodeeriv järjestus soovitud lõikamiskohtadega ning NS5 järjestuse lõpp. **(I B)** PCR mutageneesi abil viiakse NS5 valgu kodeeriva järjestuse lõppu sisse GAA mutatsioon. **(II)** Täispikk NS5 sisestatakse pMC-gtGTU-ZIKV-PL vektorisse, milles asub *flag tag* **(III)** Täispikk NS5 koos *flag tag*-iga sisestatakse pcDNA4/TO ekspressioonivektoris **(IV)** Punktis III saadud konstrukts asendatakse metsiktüüpi NS5 lõpp GAA mutatsiooni sisaldava järjestusega.

### ***Kloneerimine: I aste***

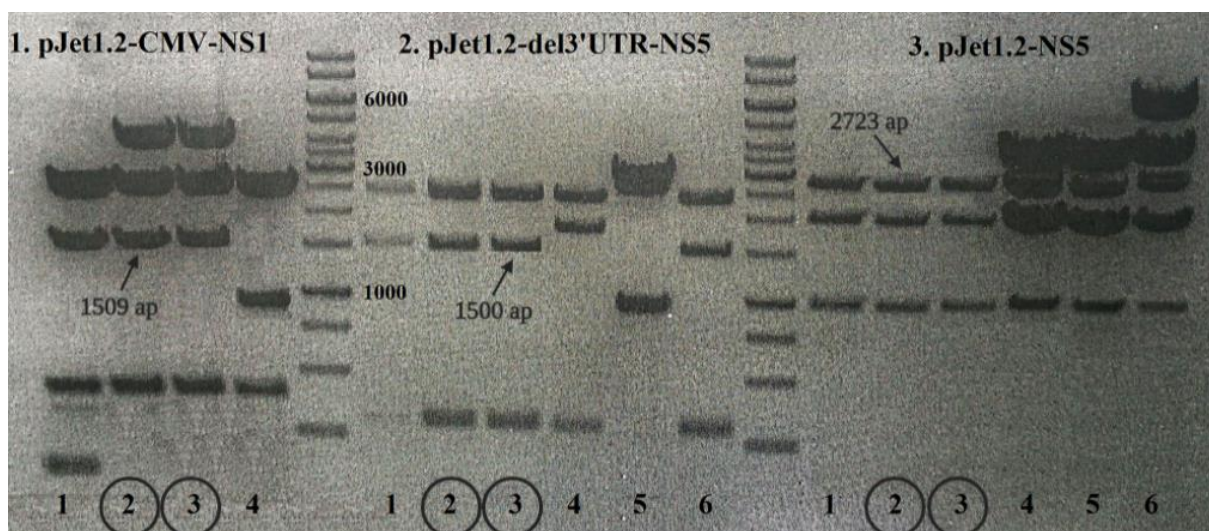
Kloneerimise I astmes sooviti saavutada järgmised eesmärgid:

- Saada kloneerimiseks vajalikud fragmendid: CMV promooter, NS1 algusjärjestus, del3'UTR-WT-NS5 ning del3'UTR-GAA-NS5 (kloneerimisskeemidel punktid IA, IB ja IC);
- Ligeerida saadud fragmendid pJet1.2-Blunt vektorisse paljundamise ja sekveneerimise eesmärgil;
- Paljundada juurde plasmiidseid DNA-d minipreparatsioon meetodil;
- Viia läbi restriksioonanalüüs kontrollimaks plasmiidide õigsust ning saata sobivaimad sekveneerimisele, et kontrollida järjestuste õigsust.

Et valmistada kloneerimiseks vajaminevad fragmendid, kasutati klassikalist PCR-i, SPLICE-PCR-i ning PCR-mutageneesi. PCR produktide olemasolu kontrolliti esmalt geel-elektroforeesil. Et paljundada ja sekveneerida saadud fragmente, ligeeriti nad pJet1.2-Blunt vektoritesse ja transformeeriti kompetentseid bakterirakke ligatsioonisegudega. Transformatsioonitassidelt valiti 4-6 kolooniat, millest edasi eraldati plasmiidset DNA-d minipreparatsioonil. Puhastatud minipreparatsioone kontrolliti restriksioonanalüüsil kasutades samu restriктаase, millega sooviti hiljem kloneerida. (Joonis 10, Joonis 11) Nii oli võimalik ühtlasi kontrollida vajalike lõikamiskohtade olemasolu. Paksult on märgistatud PCR meetodil saadud (edasi kloneerimiseks vajaliku) fragmendi suurus.

- pJet1.2-CMV-NS1 (sisaldab kokku “splaissitud” CMV promooteri ja NS1 algust): MssI (PmeI) ja XmaJI (AvrII). Fragmentide suurused: 2588, **1509**, 401 ap;
- pJet1.2-del3'UTR-NS5 (sisaldab NS5 valku kodeeriva järjestuse lõppu, 3'UTR on eemaldatud): Bsp119I (BstBI) ja SwaI. Fragmentide suurused: 2381, **1500**, 306, 299 ap;
- pJet1.2-NS5 (sisaldab NS5 valgu kodeerivat järjestust): Eco47III (AfeI) ja XmaJI (AvrII). Fragmentide suurused **2723**, 2000, 984 ap.





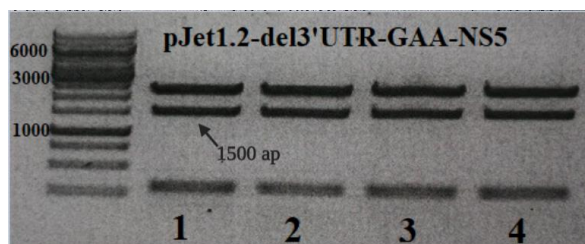
**Joonis 10.** pJet1.2 vektorisse ligeeritud PCR produktide restriksioonanalüüs. Esimeses tulbas on pJet1.2-CMV-NS1 (lõigatud MssI ja XmaII-ga), teises pJet1.2del3'UTR-NS5 (lõigatud Bsp119I ja SwaI-ga) ning kolmandas pJet1.2-NS5 (lõigatud Eco47III ja XmaII-ga) minipreparatsiooniproovid. Nooltega on tähistatud igas tulbas olevad kloonimiseks vajaminevad fragmendid. Ringiga on tähistatud proovid, mis saadeti sekveneerima. Marker – GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

Restriksioonipildi põhjal otsustati sekveneerimisele saata pJet1.2-CMV-NS1 konstruktide seast proovid 2 ja 3. Pildil on nende proovide seas näha ka lisafragmenti suurusega ~4500 ap, kuid arvestades fragmendi suurust ning proovi suurt kontsentratsiooni, on tõenäoliselt tegu mittetäielikult lõigatud plasmiidiga. pJet1.2-del3'UTR-NS5 konstrukti puhul on õiged proovid 1, 2, 3 ja 6, kuigi näha on kolme fragmenti nelja asemel. See tuleneb asjaolust, et fragmendid 306 ja 299 on niivõrd sarnase suurusega, et neid ei ole võimalik kuigi edukalt geelil lahutada. Sekveneerima saadeti neist proovid 2 ja 3. Ka konstrukti pJet1.2-NS5 jaoks valiti välja proovid 2 ja 3, kuigi korrektne on ka proov nr 1 ning ilmselt ka 4-6. Proovide 4-6 puhul on DNA kontsentratsioon väga suur, mistõttu on geelil nähtavad suuremad fragmendid tõenäoliselt osaliselt lõikamata plasmiidid.

Et valmistada nii polümeraasile kui ka replikaasile edaspidistes katsetes vajaminev negatiivne kontroll, oli tarvis viia NS5 geeni sisse polümeraasi inaktiveeriv mutatsioon. Selleks asendati polümeraasi aktiivsentrasis asuv aminohappeline järjestus GDD (Gly-Asp-Asp) GAA-ga (Gly-Ala-Ala) (Miorin *et al.*, 2008). Mutatsioon viidi sisse kasutades PCR-mutageneesi ning matriits-DNA-na kasutati eelmises sammus saadud pJet1.2-del3'UTR-NS5. (Joonis 7, samm IC, joonis 9, samm IB) Taaskord transformeeriti kompetentseid baktereid ligatsiooniseguga ning minipreparatsiooniks valiti neli kolooniat, mida kontrolliti Bsp119I (BstBI) ja SwaI restriktatsioonidega. Kuna ainus erinevus originaalmatriitsiga (GDD) on sisseviidud mutatsioon



(GAA), siis annab ka siinkohal korrektne konstrukt restriksioonipildiks fragmendid suurusega 2381, 1500, 306, 299 ap. (Joonis 11)



**Joonis 11.** pJet1.2-GAA-del3'UTR-NS5 restriksioonanalüüs. Plasmide kontrolliti Bsp119I (BstBI) ja SmaI restriktasididega; õiged plasmiidid andsid tulemiseks fragmendid suurusega 2381, 1500, 306 ja 299 ap. Noolega on tähistatud kloneerimiseks vajamineva fragmendi suurus. Marker – GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

Restriksioonipildi järgi olid kõik valitud kloonid õiged, kuid et kindlaks teha mutatsiooni olemasolu, oli vaja valitud fragmente mutatsioonikohas sekveneerida. Selle põhjal selgus, et soovitud mutatsioon oli sees ainult kloonides 2 ja 3.

### ***Kloneerimine: II aste***

Kloneerimise II astmes sooviti saavutada järgmised eesmärgid

- Kloneerimine 1 (WT LGTV Replikaas) – Fragment del3'UTR-WT-NS5 viia sisse esialgsesse pCCI-LGTV vektorisse, eemaldades sellisel moel 3'UTR ots infektsioonilisest kloonist. (Joonis 6, samm II)
- Kloneerimine 2 (GAA LGTV Replikaas) – Fragment del3'UTR-GAA-NS5 viia sisse esialgsesse pCCI-LGTV vektorisse, eemaldades nii 3'UTR ots ja viies sisse GDD → GAA mutatsioon polümeraasi aktiivtsentrisse. (Joonis 7, samm II)
- Kloneerimine A (WT LGTV Polümeraas) – Fragment NS5 viia sisse pMC-gtGTU-ZIKV-PL vektorisse, et liita polümeraasile *flag tag*. (Joonis 8, samm II)

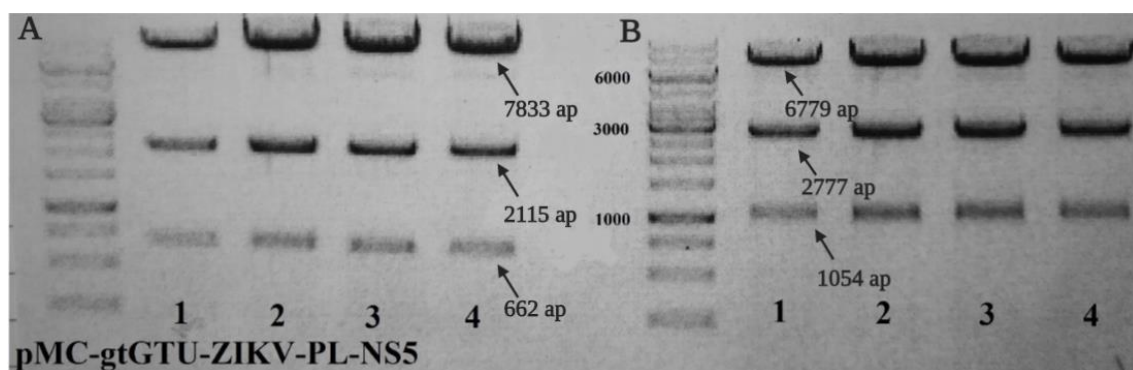
Nende eesmärkide saavutamiseks jälgiti nii siin kui ka kloneerimise järgmistes sammudes klassikalist kloneerimise põhimõtet. Esmalt lõigati nii pJet1.2 vektorites asuvad PCR produktid kui ka vektorites asuvad õige suurusega fragmendid sobivate restriktasidide abil välja ning lahutati agarosgeelil. Kasutatud restriktasidid on välja toodud tabelites 5, 6 ja 7. Seejärel ligeeriti insert ja vektor kokku ning transformeeriti ligatsioonisegudega kompetentseid *E. coli* rakke. Olenevalt transformatsiooni efektiivsusest valiti välja 4-12 kolooniat, millest valmistati plasmiidse DNA minipreparatsioonid. Puhastatud minipreparatsioone kontrolliti

restriktsoonanalüüsil kasutades samu restriктаase, mida sooviti kasutada kloneerimise järgmises astmes, vajadusel lisaks veel restriктаase, mis lõikaksid kas vektori või inserdi seest.

**Tabel 5.** Kloneerimise I astme algplasmiidid ja kasutatud restriктаasid. Jämedas kirjas on toodud kloneerimiseks kasutatud fragmentide suurused.

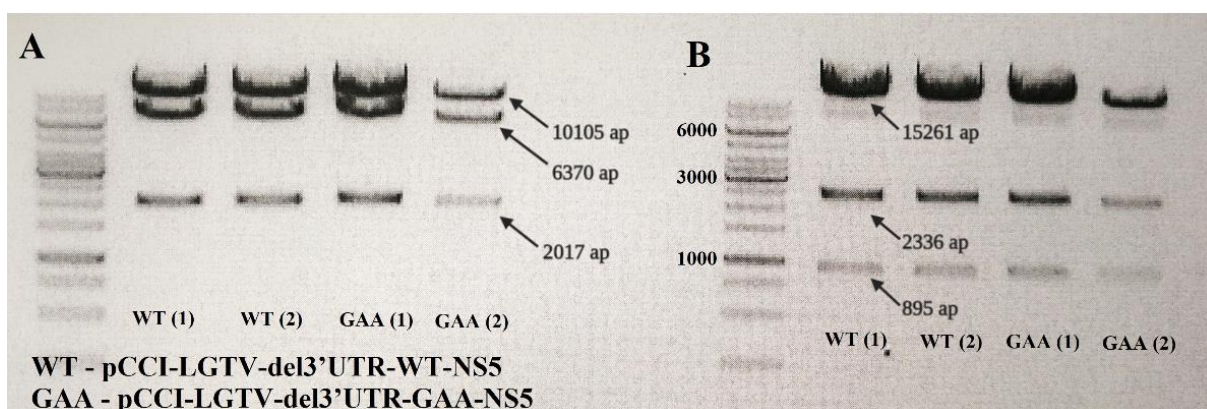
<b>Restriktsoon 1</b>	
<b>Insert</b> – pJet1.2-del3’UTR-WT-NS5	<b>Vektor</b> - pCCI-LGTV
<b>Restriктаasid:</b> Bsp119I (BstBI) ja SwaI	<b>Restriктаasid:</b> Bsp119I (BstBI) ja SwaI
Oodatud fragmendid: 2381, <b>1500</b> , 306, 299 ap	Oodatud fragmendid: <b>16992</b> , 2152 ap
<b>Ligatsioonil saadava plasmidi nimetus:</b> pCCI-LGTV-del3’UTR-WT-NS5	
<b>Restriktsoon 2</b>	
<b>Insert</b> – pJet1.2-del3’UTR-GAA-NS5	<b>Vektor</b> – pCCI-LGTV
<b>Restriктаasid:</b> Bsp119I (BstBI) ja SwaI	<b>Restriктаasid:</b> Bsp119I (BstBI) ja SwaI
Oodatud fragmendid: 2381, <b>1500</b> , 306, 299 ap	Oodatud fragmendid: <b>16992</b> , 2152 ap
<b>Ligatsioonil aadava plasmidi nimetus:</b> pCCI-LGTV-del3’UTR-GAA-NS5	
<b>Restriktsoon A</b>	
<b>Insert</b> – pJet1.2-WT-NS5	<b>Vektor</b> – pMC-gtGTU-ZIKV-PL
<b>Restriктаasid:</b> XmaJI (AvrII), Eco47III (AfeI) ja PvuI	<b>Restriктаasid:</b> XmaJI (AvrII) ja Eco47III (AfeI)
Oodatud fragmendid: <b>2723</b> , 2000, 984 ap	Oodatud fragmendid: <b>7887</b> , 46 ap
<b>Ligatsioonil saadava plasmidi nimetus:</b> pMC-gtGTU-ZIKV-PL-NS5	

Ligatsiooni A jaoks viidi läbi kaks kontrolli. Ühel juhul lõigati konstrukti XmaJI, KspAI ning NheI restriктаasidega, teisel juhul aga XmaJI, KspAI ning PvuI restriктаasidega. XmaJI ning KspAI olid vajalikud edasiseks kloneerimiseks, mistõttu oli oluline nende olemasolu kontrollida, NheI abil kontrolliti õige inserdi olemasolu ning PvuI abil õige vektori olemasolu. (Joonis 12).



**Joonis 12.** pMC-gtGTU-ZIKV-PL vektorisse viidud polümeraasi restriktsoonanalüüs. **(A)** Kontroll XmaJI, KspAI ja NheI restrikttaasidega. Õige plasmiid andis tulemuseks fragmendid suurusega 7833, 2115 ja 662 ap. **(B)** Kontroll XmaJI, KspAI ja PvuI restrikttaasidega. Õige plasmiid andis tulemuseks fragmendid suurusega 6779, 2777 ja 1054 ap. Kõik valitud proovid on õiged. Marker – GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

pCCI-BAC vektori minipreparatsioone (pCCI-LGTV-del3'UTR-WT-NS5 ja pCCI-LGTV-del3'UTR-GAA-NS5) kontrolliti esmalt kasutades EcoRI restriktsooniensüümi, õiged konstruktid andsid tulemuseks fragmendid suurusega 10105, 6370 ja 2017 ap. (Tulemus pole näidatud) Et madala koopiaarvuga plasmiidid (pCCI-BAC) annavad tavalisel minipreparatsioonpuhastusel väga madalaid kontsentratsioone, mis kloneerimiseks edasi ei ole piisavad, valiti kummagi konstrukti (WT ja GAA) hulgast kaks õiget, millest edasi valmistati indutseeritud minipreparatsioonid. Puhastatud indutseeritud minipreparatsioone kontrolliti kahe erineva restriktsooni abil: 1) lõigates EcoRI ning 2) lõigates MssI (PmeI) ja XmaJI-ga (AvrII). (Joonis 13)



**Joonis 13.** Replikaasi konstruktide indutseeritud minipreparatsioonide restriktsoonanalüüs. **(A)** Kontroll EcoRI restrikttaasiga. Õige plasmiid andis tulemuseks fragmendid 10105, 6370 ja 2017 ap. **(B)** Kontroll MssI (PmeI) ja XmaJI (AvrII) restrikttaasidega. Õiged plasmiidid andsid tulemuseks fragmendid suurusega 15261, 2336 ja 895 ap. Kõik valitud proovid on õiged. Marker – GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

### ***Kloneerimine: III aste***

Kloneerimise III astmes sooviti saavutada järgmised eesmärgid:

- Kloneerimine 1 (LGTV WT Replikaas) – fragment CMV-NS1 viia eelnevas astmes valmistatud pCCI-LGTV-del3'UTR-WT-NS5 vektorisse, et eemaldada LGTV struktuurseid valke kodeerivad järjestused ja lisada CMV promooter. (Joonis 6, samm III);
- Kloneerimine 2 (LGTV GAA Replikaas) – fragment CMV-NS1 viia eelnevas astmes valmistatud pCCI-LGTV-del3'UTR-GAA-NS5 vektorisse, et eemaldada LGTV struktuurseid valke kodeerivad järjestused ja lisada CMV promooter. (Joonis 7, samm III);
- Kloneerimine A (LGTV WT Polümeraas) – fragment NS5-*flag tag* viia pcDNA ekspressioonikonstrukti. (Joonis 8, samm III).

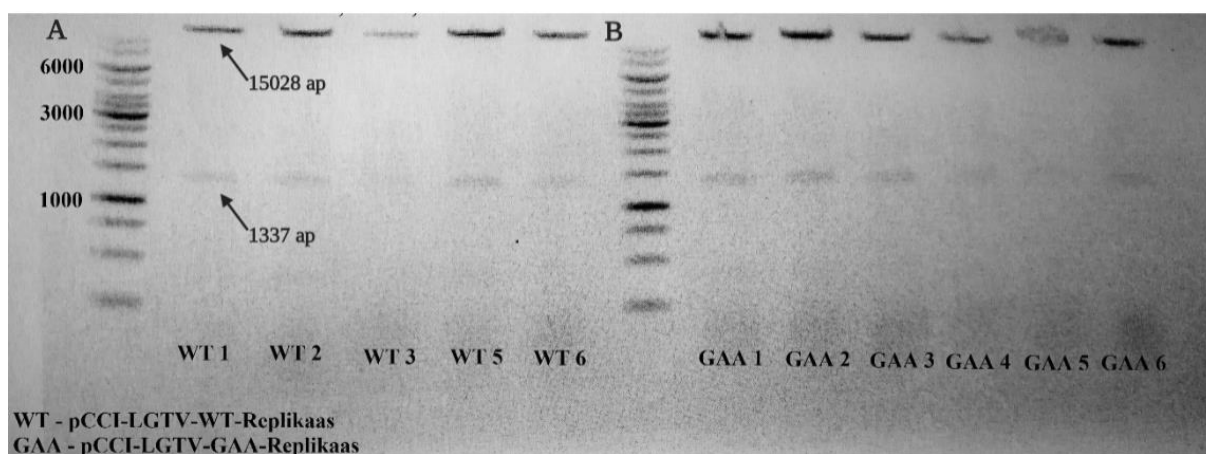
Ka siinkohal jälgiti eesmärkide täitmiseks samu samme, mis kloneerimise II astmeski (lk 33-34). Täpsemalt kasutatud restriктаasid on välja toodud tabelis 6.

**Tabel 6.** Kloneerimise II astme algplasmiidid ja kasutatud restriктаasid. Jämedas kirjas on näidatud edasises kloneerimises kasutatud fragmentide suurused.

<b>Restriksioon 1</b>	
<b>Insert</b> – pJet1.2-CMV-NS1	<b>Vektor</b> – pCCI-LGTV-del3'UTR-WT-NS5
<b>Restriктаasid:</b> MssI (PmeI) ja XmaJI (AvrII)	<b>Restriктаasid:</b> MssI (PmeI) ja XmaJI (AvrII)
Oodatud fragmendid: 2588, <b>1509</b> , 401 ap	Oodatud fragmendid: <b>15261</b> , 2336, 895 ap
<b>Saadava plasmidi nimetus:</b> pCCI-LGTV-WT-replikaas	
<b>Restriksioon 2</b>	
<b>Insert</b> – pJet1.2-CMV-NS1	<b>Vektor</b> – pCCI-LGTV-del3'UTR-GAA-NS5
<b>Restriктаasid:</b> MssI (PmeI) ja XmaJI (AvrII)	<b>Restriктаasid:</b> MssI (PmeI) ja XmaJI (AvrII)
Oodatud fragmendid: 2588, <b>1509</b> , 401 ap	Oodatud fragmendid: <b>15261</b> , 2336, 895 ap
<b>Ligatsioonil saadava plasmidi nimetus:</b> pCCI-LGTV-GAA-replikaas	

Restriktatsioon A	
<b>Insert</b> – pMC-gtGTU-ZIKV-PL-NS5- <i>flag tag</i>	<b>Vektor</b> – pcDNA4/TO
<b>Restriktaasid:</b> XmaJI (AvrII) (tömbistatud) ja KspAI (HpaI)	<b>Restriktaas:</b> Eco32I (EcoRV)
Oodatud fragmendid: 7833, <b>2777</b> ap	Oodatud fragment: <b>5078</b> ap (lineariseeritud vektor)
<b>Ligatsioonil saadava plasmidi nimetus:</b> pcDNA-LGTV-WT-NS5- <i>flag tag</i>	

Replikaaside minipreparatsioone otsustati kontrollida HindIII restriktiaasiga. (Joonis 14) Sellisel juhul pidi lõikamispildiks nii GAA kui ka metsiktüve jaoks tulema fragmendid suurusega 15028, 1337 ja 405 ap. Kuid kuna pCCI vektor on madala koopia arvuga, ei saavutatud minipreparatsioonil piisavalt suurt DNA kontsentratsiooni, et anda selget restriktioonipilti. On näha kahte suuremat fragmenti (arvatavasti 15028 ap ja 1337 ap), kuid fragmenti suurusega 405 ap mitte kuigi hästi. Restriktioonipildi põhjal valiti maxipreparatsiooni valmistamiseks proovid WT 2 ja GAA 2.

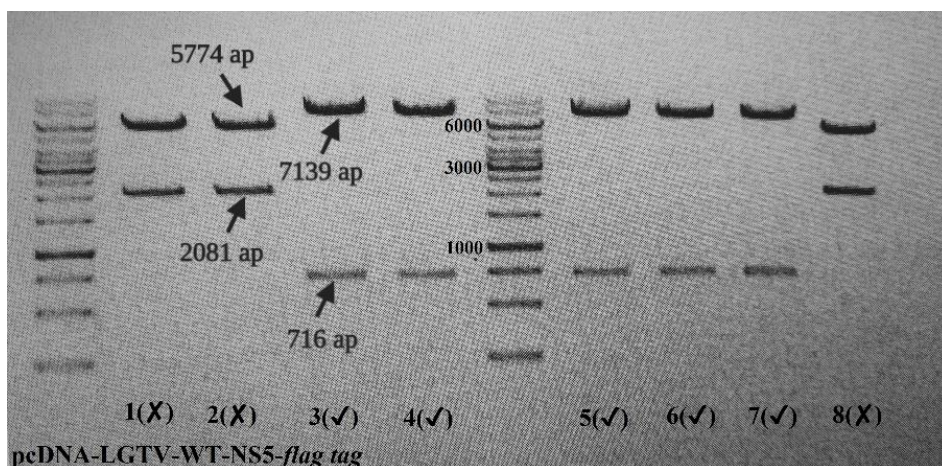


**Joonis 14.** Replikaasi konstruktide metsik (WT)- ja GAA mutatsiooni sisaldavate plasmiidide restriktioonipilt. Kõiki proove lõigati HindIII restriktiaasiga. Korrektsed plasmiidid andsid restriktioonipildiks fragmendid suurusega 15028, 1337 ja 405 ap. Õiged on kõik valitud proovid. (A) – metsiktüüpi replikaasi proovid (B) – GAA mutatsiooni sisaldava replikaasi proovid. Marker – GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

Kuna konstrukti A puhul (NS5 polümeraasi ekspressioonivektor) viidi läbi tömpide otstega kloneerimine, mis tähendab, et insert võis siseneda nii õiges kui ka vales orientatsioonis, oli siinkohal oluline konstrukti kontrollida mõne sellise restriktiaasiga, mis kummalgi juhul annaks piisavalt erinevad restriktioonimustrid. Selliseks ensüümiks sobis EcoRI. Kui insert paiknes



õiges orientatsioonis, tulid fragmentide suurusteks 7139 ja 716 ap, kui aga vales orientatsioonis, siis 5774 ja 2081 ap. Joonisel 15 on näha kahte tüüpi lõikamismustrit, nagu oligi oodatud. Seetõttu oli võimalik proove 3 kuni 7 kasutada ka edasises kloneerimises.



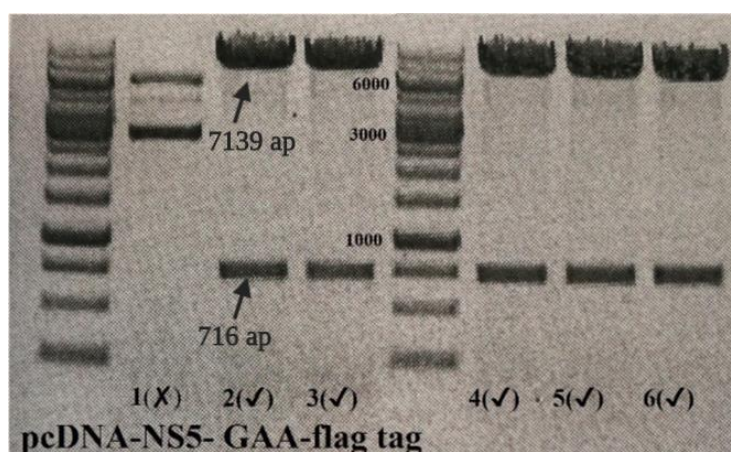
**Joonis 15.** pcDNA-LGTV-NS5-*flag tag* restriksioonanalüüs. Minipreparatsioone kontrolliti EcoRI restriктаasiga. Inseti “õige” orientatsiooni puhul on fragmentide suuruseks 7139 ja 716 ap, “vale” orientatsiooni puhul 5774 ja 2081 ap. Linnukesega on märgitud õige restriksioonimustriga proovid. Marker – GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

### ***Kloneerimine: IV aste***

Kloneerimise IV astmes oli vaid üks eesmärk: viia LGTV NS5 polümeraasi kodeeriva järjestuse sisse GDD→GAA mutatsioon, et saada ka selle jaoks negatiivne (ensümaatiliselt inaktiivne polümeraas) kontroll. Selleks kasutati PCR-mutageneesil saadud pJet1.2-del3'UTR-GAA-NS5 fragmenti, mis viidi Kloneerimise A III astmes saadud pcDNA-LGTV-NS5-*flag tag* konstrukti. (Joonis 9, samm IV) Selleks jällegi lõigati restriктаaside abil soovitud DNA jupid (vektor ja insert) välja ning ligeeriti nad omavahel kokku. Täpsed kloneerimiseks kasutatud restriктаasid on välja toodud tabelis 7. Transformatsioonil saadud *E. coli* kloone eraldati minipreparatsioonpuhatuse meetodil. Et kontrollida valmistatud plasmiidide õigsust, lõigati puhastatud DNA-d EcoRI restriктаasiga. Sarnaselt metsiktüüpi konstruktile, andsid ka siinkohal õiged kloonid tulemuseks fragmendid suurusega 7139 ja 716 ap. (Joonis 16)

**Tabel 7.** Kloneerimise III astmes kasutatud restriктаasid ja algplasmiidid. Jämedas kirjas on näidatud kloneerimiseks kasutatud fragmentide suurused.

Restriksioon B	
<b>Insert</b> – pJet1.2-del3'UTR-GAA-NS5	<b>Vektor</b> – pcDNA-NS5- <i>flag tag</i>
<b>Restriктаasid:</b> Bsp119I (BstBI) ja NheI	<b>Restriктаasid:</b> Bsp119I (BstBI) ja NheI
Oodatud fragmendid: 3598, <b>888 ap</b>	Oodatud fragmendid: <b>6967</b> , 888 ap
<b>Ligatsioonil saadava plasmidi nimetus:</b> pcDNA-LGTV-GAA-NS5- <i>flag tag</i>	

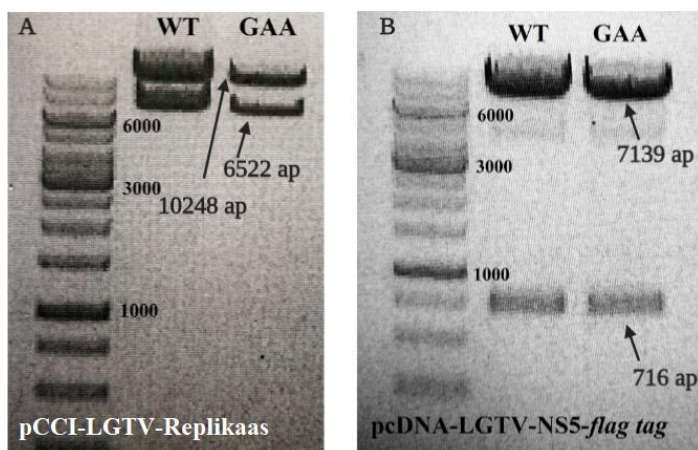


**Joonis 16.** pcDNA-LGTV-GAA-NS5-*flag tag* minipreparatsioonide restriksioonanalüüs. Konstrukte kontrolliti EcoRI restriктаasiga. Õiged plasmiidid andsid suuruseks fragmendid 7139 ja 716 ap. Pildil proovid 2 kuni 6 annavad soovitud restriksioonimustri. Marker – GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

### ***Midi- ja indutseeritud maxipreparatsioonide restriksioonanalüüs***

Kuna edasistes koekultuurikatsetes oli vaja suuremas koguses hea kvaliteediga DNA-d, viidi lõplike konstruktide jaoks läbi midipreparatsioon (pcDNA vektori põhjal polümeraasi konstruktid) ning indutseeritud maxipreparatsioon (pCCI-BAC vektori põhjal replikaasi konstruktid). Selleks valiti igale konstruktile vastav üks korrektne koloonia, mida külvati vastavasse vedelsöötmesse (pcDNA konstruktide puhul LB sööde ja pCCI-BAC konstruktide puhul SOY sööde). Kõiki külve kasvatati loksutil (37°C, 220 pööret minutis). Midipreparatsioonide jaoks piisas 18 tunnist inkubeerimisest; indutseeritud maxipreparatsioonide jaoks inkubeeriti bakterikultuuri esmalt 16 tundi, siis lisati juurde söödet koos L-arabinoosiga (induktsioon) ning inkubeeriti veel 5 tundi. Edasi puhastati konstruktid nagu kirjeldatud metoodika peatükkides 2.2.11 ja 2.2.12. (Lk 24-25)

Konstrukte 1 ja 2 (pCCI-LGTV-WT-replikaas ja pCCI-LGTV-GAA-replikaas) kontrolliti Bsp119I restriktasiga. Õiged konstruktid andsid tulemuseks fragmendid suurusega 10248 ja 6522 ap. Konstrukte A ja B (pcDNA-LGTV-WT-NS5-*flag* ja pcDNA-LGTV-GAA-NS5-*flag*) kontrolliti EcoRI restriktasiga. Õiged konstruktid andsid tulemuseks fragmendid suurusega 7139 ja 716 ap. (Joonis 17)



**Joonis 17.** (A) Metsiktüüpi ja GAA mutatsiooni sisaldava Langat viiruse replikaasi (pCCI-LGTV-WT-replikaas ja pCCI-LGTV-GAA-replikaas, indutseeritud maxipreparatsioon) restriktsoonanalüüs. Konstrukte lõigati Bsp119I restriktasiga, korrektsed kloonid andsid restriktsoonipildiks fragmendid suurusega 10248 ja 6522 ap. Nii metsiktüvi kui ka GAA mutatsiooni sisaldav tüvi on õiged. (B) Metsiktüüpi ja GAA mutatsiooni sisaldav Langat viiruse polümeraasi (pcDNA-LGTV-WT-NS5-*flag* ja pcDNA-LGTV-GAA-NS5-*flag*, midipreparatsioon) restriktsoonanalüüs. Konstrukte lõigati EcoRI restriktasiga. Õiged konstruktid andsid restriktsoonipildiks fragmendid suurusega 7139 ja 716 ap. Mõlemad kloonid on korrektsed. Marker – GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

### 2.3.2 Immunofluorestentsanalüüs

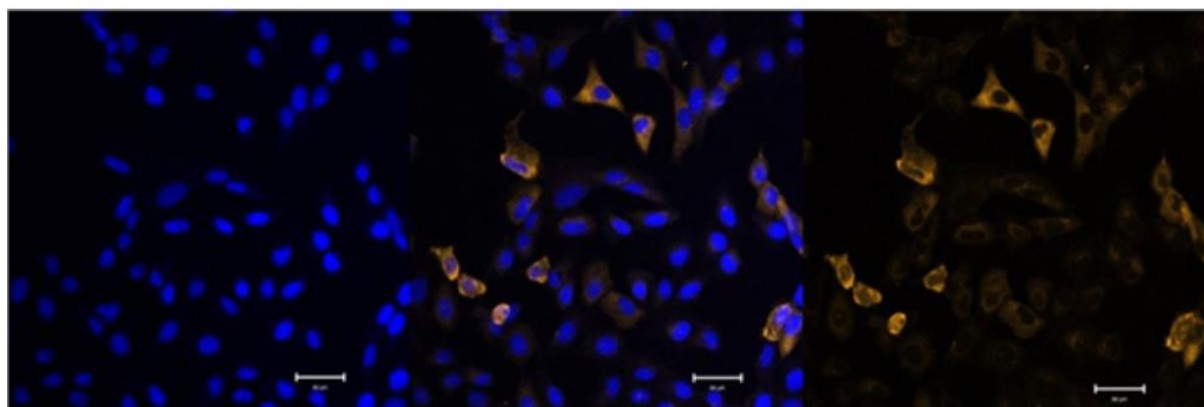
Immunofluorestentsanalüüsi jaoks transfecteeriti katteklaasil kasvanud rakke uuritava ekspressioonivektoriga ning töödeldi sobivate primaarsete ja sekundaarsete antikehadega, mida on täpsustatud metoodika peatükis 2.2.14, lk 26. Saadud tulemused on toodud välja joonistel 18 ja 19. Tabelis 8 on välja toodud ekspresseeritud valkudele vastav primaarne ja sekundaarne antikeha koos kasutatud lahjendustega. Lisaks uuritavatele konstruktidele transfecteeriti rakke ka EGFP-d (*enhanced green fluorescent protein*, võimendatud roheliselt fluorestseeruv valk) ekspresseeriva vektoriga (pEGFP-N1, Clontech), et hinnata transfectiooni efektiivsust. Üldjuhul oli transfectiooni efektiivsus 60-70%.



**Tabel 8.** Immunofluorestsentsanalüüsil kasutatud antikehad ja nende lahjendused (sulgudes).

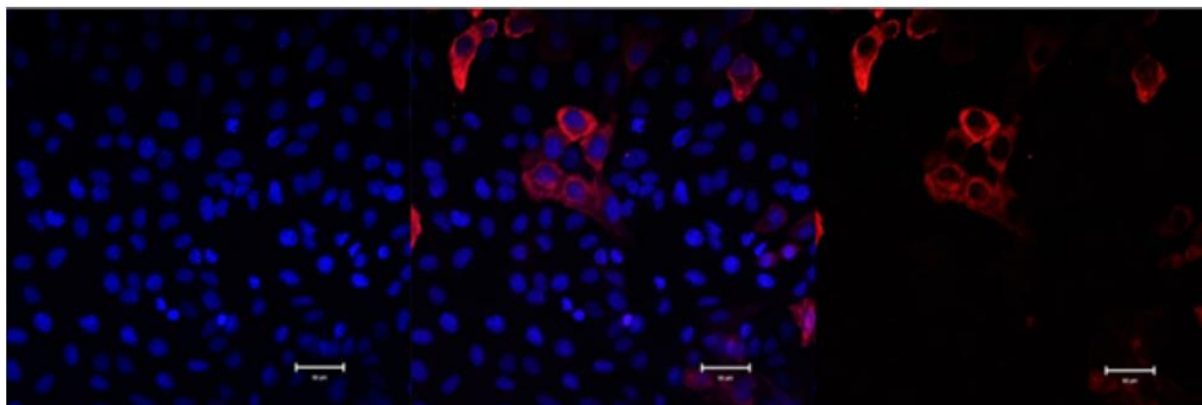
Konstrukt	Primaarne antikeha	Sekundaarne antikeha
pCCI-LGTV-Replikaas (WT ja GAA)	anti-TBEV-NS3 (1:500)	anti-kana(IgY)-Dylight549 (oranž) (1:500)
pCCI-LGTV-Replikaas (WT ja GAA)	anti-TBEV-NS5 (1:1000)	anti-kana(IgY)-Dylight549 (oranž) (1:500)
pcDNA-LGTV-NS5- <i>flag tag</i> (WT ja GAA)	anti-TBEV-NS5 (1:500)	anti-kana(IgY)-Dylight549 (oranž) (1:500)
pcDNA-LGTV-NS5- <i>flag tag</i> (WT ja GAA)	anti- <i>flag</i> (1:500)	anti-hiir(IgG)-Alexa568 (punane) (1:500)

pcDNA-LGTV-WT-NS5-*flag tag*  
anti-TBEV-NS5 (Dylight549)



**Joonis 18.** Immunofluorestsentsanalüüs U2OS rakkudest transfecteeritud pcDNA-LGTV-WT-NS5-*flag* ekspresseeriva konstruktiga. Transfecteeritud rakud on fikseeritud 48 h pärast transfectsiooni ja töödeldud anti-TBEV-NS5 primaarse antikehaga ning Dylight549-konjugeeritud sekundaarse antikehaga. Siniselt (DAPI) on värvitud rakutuumad. Valge kriipsuga on tähistatud skaala 50 µm.

pcDNA-LGTV-GAA-NS5-*flag tag*  
anti-*flag tag* (Alexa568)



**Joonis 19.** Immunofluorestsentsanalüüs U2OS rakkudest transfecteeritud pcDNA-LGTV-GAA-NS5-*flag tag* ekspresseeriva konstruktiga. Transfecteeritud rakud on fikseeritud 48 h pärast transfectsiooni ja töödeldud anti-*flag tag* primaarse antikehaga ning AlexaFluor568-konjugeeritud sekundaarse antikehaga. Siniselt (DAPI) on värvitud rakutuumad. Valge kriipsuga on tähistatud skaala 50  $\mu$ m.

Joonistelt 18 ja 19 on näha, et nii polümeraasi metsiktüüpi kui ka GAA mutatsiooni sisaldav konstruktid on võimelised ekspresseerima uuritavat LGTV NS5 polümeraasivalku. Samuti on näha, et ekspressioon toimub tsütoplasmas, mis vastab kirjanduses kirjeldatule (Werme, *et al.*, 2008).

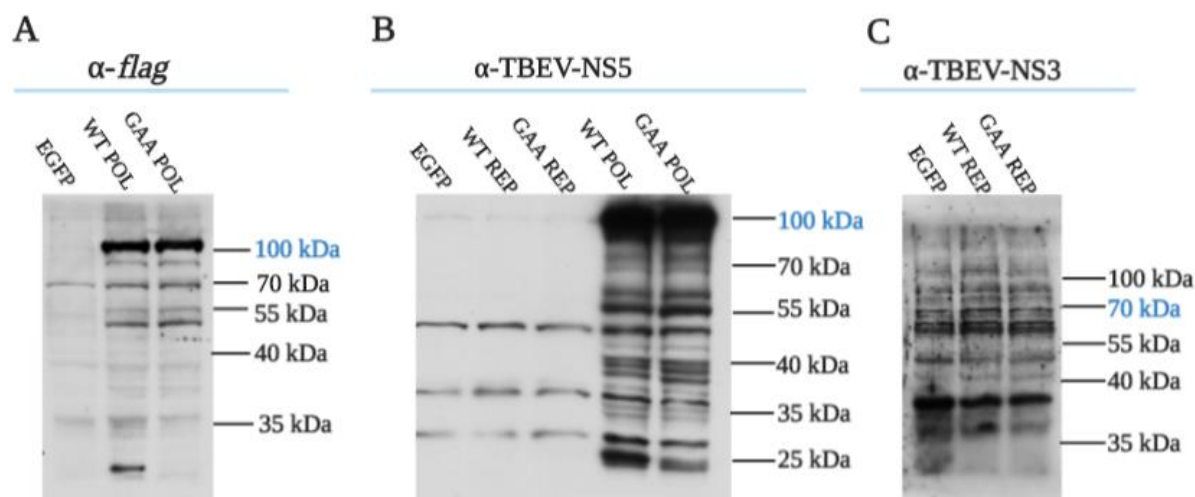
Immunofluorestsentsanalüüs ei andnud nähtavat ekspressiooni nii metsiktüüpi kui ka GAA mutatsiooni sisaldavat replikaasi konstrukti jaoks. (Tulemus pole näidatud)

### 2.3.3 Western blot analüüs

Sarnaselt immunofluorestsentsanalüüsiga transfecteeriti U2OS rakke nii soovitud LGTV replikaasi ja NS5 polümeraasi ekspressioonivektoritega kui ka negatiivse kontrollina EGFP-d ekspresseeriva plasmiidiga. Rakud lüüsi 48 h pärast transfectsiooni Laemmli puhvris ning valgud denatureeriti 100°C juures 10 minutit. Pärast SDS-PAAG geelil lahutamist kanti nad üle nitrotselluloosmembraanile, membraan blokiti 5% lõssipulbrilahuses ning membraani inkubeeriti primaarsete ja sekundaarsete antikehadega, (täpsustatud meetodika peatükis 2.2.14, lk 26-27), mis on koos lahjendustega välja toodud tabelis 9. Lõpuks ilmutati HRP-signaalid röntgenfilmile. Saadud tulemused on esitatud joonisel 20.

**Tabel 9.** Western blot analüüsil kasutatud antikehad ja lahjendused (sulgudes).

Konstrukt	Primaarne antikeha	Sekundaarne antikeha
pCCI-LGTV-Replikaas (WT ja GAA)	anti-TBEV-NS3 (1:1500)	anti-kana(IgY)-HRP (1:5000)
pCCI-LGTV-Replikaas (WT ja GAA)	anti-TBEV-NS5 (1:1500)	anti-kana(IgY)-HRP (1:5000)
pcDNA-LGTV-NS5- <i>flag tag</i> (WT ja GAA)	anti-TBEV-NS5 (1:1500)	anti-kana(IgY)-HRP (1:5000)
pcDNA-LGTV-NS5- <i>flag tag</i> (WT ja GAA)	anti- <i>flag</i> (1:1000)	anti-hiir(IgG)-HRP (1:10 000)



**Joonis 20.** LGTV replikaasi ja polümeraasi ekspressioonikonstruktide analüüs transfecteeritud U2OS rakkude lüsaatides western blot meetodil. **(A)** Langat viiruse NS5 polümeraasi ekspressiooni kontroll *flag tag*-i vastase antikehaga. **(B)** Langat viiruse NS1-5 replikaasi ja NS5 polümeraasi ekspressiooni kontroll NS5 valgu vastase antikehaga. **(C)** Langat viiruse NS1-5 replikaasi ekspressiooni kontroll NS3 valgu vastase antikehaga. POL – polümeraas; REP – replikaas; EGFP – negatiivne kontroll (EGFP-d ekspresseeriva plasmiidiga transfecteeritud U2OS rakkude lüsaat); WT – metsiktüüp; GAA – GAA mutatsiooni sisaldav inaktiveeritud polümeraasiga konstrukt. Marker – PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (ThermoFischer)

Western bloti tulemuste põhjal selgus, et soovitud valke ekspresseerivad ainult LGTV NS5 polümeraasi konstruktid. Nii *flag tag*-i kui ka NS5 valgu vastaste antikehadega töödeldes on näha valku suuruses ~100 kDa nagu varem kirjeldatud (Bollati *et al.*, 2010). Lisaks soovitud valgule, on näha ka palju ebaspetsiifilisi signaale, mis võib olla seotud sellega, et membraane ilmutati ülitundlike reagentidega (*SuperSignal™ West Femto*), mis viib üldise ebaspetsiifilise “fooni” võimendamisele.

Sobiva suurusega valke on näha ka LGTV replikaasi ekspresseerivate konstruktide western blot analüüsis (Joonis 20, paneel C, ~70 kDa juures), kuid paraku esinevad täpselt samad fragmendid sama intensiivsusega ka EGFP-d ekspresseeriva konstruktiga transfekteeritud rakkude lüsaatides, mis tähendab, et tegu on antikehade ebaspetsiifilise seondumisega. Oodatud valkude suurused replikaasi konstruktide jaoks oleksid pidanud olema NS3 vastase antikehaga töödeldes 69 kDa ning NS5 vastase antikehaga töödeldes 103 kDa (Bollati *et al.*, 2010).

#### **2.3.4 Sekveneerimine**

Nii immunofluorestsents- kui ka western blot analüüs näitasid, et valmistatud LGTV replikaasi kodeeritud vektoritest ekspressioon ei toimunud või ei tundnud nii anti-TBEV-NS5 kui ka anti-TBEV-NS3 antikehad neid ära. Seetõttu otsustati vea tuvastamiseks mõlemad (metsiktüüp ja GAA mutatsiooni sisaldav) replikaasi kodeerivad ekspressioonikonstruktid üle sekveneerida. Sekveneerimine näitas, et ühtegi lisanduvat mutatsiooni replikaaside kodeerivates järjestustes ei esine.

#### **2.3.5 Arutelu**

Antud töö esimeses pooles viidi läbi mitmeastmeline kloneerimine saamaks Langat viiruse uurimisel vajaminevad replikaasi, polümeraasi ning nendele vastavad negatiivsete kontrollide (inaktiveeritud polümeraasiga) ekspressioonikonstruktid, teises pooles aga kontrolliti valmistatud vektorite võimet ekspresseerida soovitud valke koekultuuris, kasutades immunofluorestsents- ja western blot analüüsi. Mitmed restriksioonanalüüsid ja ka koekultuurikatsed kinnitasid, et kloneerimine on olnud edukas nii metsiktüüpi kui ka GAA mutatsiooni sisaldava NS5 polümeraasi jaoks. Restriksioonanalüüsidel tekkisid kindlate restriktiivasega lõigates õige suurusega fragmendid, immunofluorestsentsanalüüsil oli NS5 valgu ekspressiooni näha tsütoplasmas, nagu puukentsefaliidiviirustele kohane (Werme *et al.*, 2008), ka western blot analüüsil oli näha õiges suuruses valku ehk ~100 kDa (Bollati *et al.*, 2010). Niisiis sobivad antud töö käigus valmistatud konstruktid kasutamiseks edasistes uuringutes.

Ka NS1-NS5 replikaasi konstruktide korral olid restriksioonanalüüside tulemused sobivad ega viitanud vigadele. Samas selgus töö teises pooles läbi viidud ekspressiooni uurimisel, et Langat viiruse replikaasi konstruktid ei anna western blot analüüsil selget ega soovitud ekspressiooni

ehk ~69 kDa suurust signaali NS3 valgu vastase antikehaga ning ~103 kDa suurust signaali NS5 vastase antikehaga töödeldes. (Bollati *et al.*, 2010). Ekspressiooni polnud näha ka immunofluorestsentsanalüüsil. Kuna ekspressioon tuvastati NS5 valgu vastase antikehaga polümeraasi konstruktis (pcDNA-LGTV-NS5-*flag tag*), annab see alust arvata, et viga ei seisne kasutatud antikehades, vaid kas siis konstruktides või transfektsioonis endas. Et jõuda selgusele, kas viga võib seisneda replikaasis endas, sekveneeriti nii metsiktüüpi kui ka GAA mutatsiooni sisaldav replikaasi konstrukt (pCCI-LGTV-Replikaas) läbi. Huvitaval moel ei esinenud replikaasis endas ühtki soovimatut mutatsiooni.

On oluline arvestada, et LGTV replikaasi kodeerivad järjestused asuvad pCCI-BAC vektoris, mis on madala koopiaarvuga ning seetõttu on nende puhastamine mahuliselt suurest bakteriaalsest materjalist palju keerulisem. Bakteriaalsetest rakkudest tulenev jääk DNA preparatsioonis on aga eukarüootsetele rakkudele üsna toksiline, mistõttu on oluline eukarüootsete rakkude transfektsiooni protokollki kindla konstrukti jaoks optimeerida, et leida kõige sobivam DNA kogus rakkudesse viimiseks. Seda aga antud töö raames pole tehtud. Lisaks on replikaasi ekspresseerivad lõppkonstruktid väga suured (~16 700 bp pikad), mis samuti raskendab ekspressiooni edukat toimimist. Nagu igas eksperimentaalses töös, ei saa ka siinkohal välistada probleemide tekkepõhjuseks inimlikke vigu, kas siis katsete planeerimisel või läbiviimisel.

Replikaasi ekspresseerivate konstruktide parandamiseks võib proovida erinevaid meetodeid. Esmalt võib proovida kloneerida replikaasi kodeeriva osa uude pCCI-4K vektorisse (mis on küll madala koopiaarvuga vektor, kuid oluliselt väiksem võrreldes pCCI-BAC vektoriga), võimalusel isegi pcDNA4/TO vektorisse. Samuti võiks viia transfektsiooni läbi erinevate DNA kontsentratsioonidega, et leida kõige optimaalsem kogus ekspressiooniks, kuid minimaalse toksilise efektiga eukarüootsetele rakkudele.

Saadud polümeraasi ja replikaasi konstrukte on võimalik edaspidi kasutada mitmetes eri uuringutes. Üks võimalus oleks hinnata eukarüootsete rakkude tüüp I interferoonvastust loodud konstruktidele (rakus üksinda ekspresseeritud LGTV replikaas ja polümeraas). Samuti võiks uurida LGTV replikaasi võimet replitseerida mõndade teiste heteroloogsete flaviviiruste RNA-d.

## KOKKUVÕTE

Viirused on obligatoorsed parasiidid, kes nakatavad nii baktereid, loomi, taimi, seeni kui ka teisi viiruseid. Kuigi suur osa neist ei põhjusta meile erilisi terviseprobleeme, on ka neid, millega nakatumine võib põhjustada eluaegseid tüsistusi või isegi surma. Nende hulka kuuluvad ka puukentsefaliidiviirused.

Puukentsefaliidiviirused kuuluvad sugukonda *Flaviviridae*. Flaviviirused kodeerivad kümmet valku, millest kolm esimest kodeeritud RNA genoomi avatud lugemisraamis (nukleokapsiid, membraani prekursor ja ümbris) on vajalikud genoomi pakkimiseks ning ülejäänud seitse (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) moodustavad replikaasi, mis vastutab genoomi paljundamise eest. (Lindenbach, 2001) Langat viirus kui inimesele mittepatoogeenne viirus on aastaid olnud puukentsefaliidi patogeneesi uurimisel ja TBEV-vastase vaktsiini väljatöötamisel kasulik ja ohutu mudel.

Antud töö eesmärgiks oli luua Langat viiruse RNA polümeraasi, replikaasi ning nendele vastavate negatiivsete kontrollide (inaktiveeritud polümeraasiga) ekspressioonikonstruktid. Konstruktide klonereimise õnnestumist hinnati immunofluoresents- ja western blot analüüsi abil. LGTV NS5 polümeraasi ja vastava GAA mutatsiooni sisaldava vektorite ekspressioon osutus edukaks. Samas replikaasi metsiktüüpi ja GAA mutatsiooni sisaldavad vektorid ei näidanud selgelt ekspressiooni imetajarakkude koekultuuris. Et uurida, kas põhjus võib seisneda mutatsioonides või valede fragmentide kasutamisel klonereimisel, analüüsiti LGTV replikaase kodeerivaid konstrukte sekveneerimisel. Sekveneerimine ei näidanud mutatsioone, mis tähendab, et probleem seisneb mõnes muus asjaolus. On võimalik, et transfektsioon ei olnud piisavalt edukas, kuna transfektsiooni protokoll ei olnud antud konstrukti jaoks optimeeritud. Probleemi lahendamiseks võiks proovida replikaasid klonereida uude vektorisse või proovida transfektsiooni läbi viia erinevatel plasmiidse DNA kogustel.

Valmistatud konstrukte on võimalik kasutada mitmetel eesmärkidel. Käesoleva bakalaureusetöö edasiarendusena võiks uurida ka valmistatud konstruktide võimet kutsuda imetajarakkudes esile tüüp I interferoonvastust ning vaadata, kas valmistatud replikaas suudab replitseerida ka teiste heteroloogsete flaviviiruste matriitse.

## RESÜMEE/ SUMMARY

### *Cloning and analysis of Langat virus RNA polymerase and replicase expression constructs*

Marilin Kuusk

#### Summary

The increasing infection rate with tick-borne encephalitis viruses possesses a serious concern, as the infection can result in several neurological diseases such as meningitis, encephalitis, and meningoencephalitis. About 1-2% of infections cause death. (Yoshii, 2019; Chrdle, *et al.*, 2016) Langat virus of the tick-borne encephalitis group, however, is not known to cause disease in humans. For this reason, several Langat virus based live attenuate vaccines have been developed and tested, unfortunately, to no avail. (Shapoval, 1989; Pletnev and Men, 1998) Still, Langat virus remains an interesting topic of study, as there might be alternative ways of using it to treat infections of TBEV-s. Alternatively, it can be used to learn the functions of flavivirus non-structural proteins as their individual roles in replication are still a relatively unstudied topic.

In the given Bachelor's thesis, four constructs were cloned and their expression was tested using western blot and immunofluorescent analysis. The aim was to create constructs for RNA polymerase (NS5), replicase (NS1-NS5) and their respective negative controls by inactivating the active site of the NS5 RNA polymerase protein. Based on the data obtained from restriction, immunofluorescent and western blot analyses, cloning of RNA polymerase constructs was successful and the created plasmids can be used in further studies. However, expression was not detectable in case of replicase-encoding constructs. The author speculated that the problem might lie in wrong fragments having been used in cloning or mutations occurring during propagation of plasmids in bacteria; however, sequencing of replicase constructs revealed no additional mutations in the replicase coding sequence. Another possible explanation would be that transfection of eukaryotic cells was inefficient due to unsuitable amount of plasmid DNA (transfection conditions have not been optimized in this study). Last, but not least, low copy pCCI-BAC vectors are difficult to isolate from bacteria with sufficient purity grade, that gives significant contamination from bacterial cells and thus are quite toxic to eukaryotic cells. Those theories could be tested by cloning the replicase into a new pCCI-4K or pcDNA vector and by titrating different amounts of plasmid DNA for transfection. Basic human errors while designing and conducting experiments should also be considered as the potential source of problem.

Created LGTV polymerase and replicase expression constructs have a large variety of different applications. For instance, they could be used to assess type I interferon response in cells. It would also be interesting to see if the Langat virus replicase has the ability to replicate artificial templates of other heterologous flaviviruses.



## TÄNUSÕNAD

Täna südamest oma juhendajaid Eva Žusinaidet ning Sandra Koitu, kes aitasid töö planeerimisel ning kannatlikult ja abivalmilt mind alati nõustasid, õpetasid ja suunasid. Täna ka kõiki teisi rakendusviroloogia töörühma inimesi, kes vajadusel alati aitasid ning oma nippe jagasid.

## KASUTATUD KIRJANDUS

**Bollati, M., Alvarez, K., Assenberg, R., et al. (2010).** Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antiviral research.* 87 (2), lk. 125-148.

**Bressanelli, S., Stiasny, K., Allison, S.L., Stura, E.A., Duquerroy, S., Lescar, J., Heinz, F.X., and Rey, F.A. (2004).** Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO J.* 23, lk. 728-738.

**Calisher, C.H. (1988).** Antigenic classification and taxonomy (family Flaviviridae) emphasizing a universal system for the taxonomy of viruses causing tick-borne encephalitis. *Acta Virologica.*, 32, lk. 469-478.

**Chrdle, A., Chmelík, V., Růžek, D. (2016)** Tick-borne encephalitis: What travelers should know when visiting an endemic country. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 12 (10), lk. 2694-2699.

**Dumpis, U., Crook, D., & Oksi, J. (1999).** Tick Borne Encephalitis. *Clinical Infectious Diseases*, 28 (4), lk. 882-890.

**Fernandez-Garcia, M.-D., Mazzon, M., Jacobs, M., Amara, A. (2009).** Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. *Cell Host & Microbe.* 5 (4), lk. 318-328.

**Füzik, T., Formanová, P., Růžek, D., Yoshii, K., Niedrig, M., ja Plevka, P. (2018).** Structure of tick-borne encephalitis virus and its neutralization by a monoclonal antibody. *Nature Communications*, 9 (1). (TBEV foto)

**Gordon Smith, C. E. (1956).** A virus resembling Russian spring-summer encephalitis virus from an ixodid tick in Malaya. *Nature.* 178 (4533), lk. 581-582.

**Grant, A., Ponia, S. S., Tripathi, S., et al. (2016).** Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. *Cell host & microbe*, 19(6), lk. 882-890.

**Gritsun, T.S., Lashkevich, V.A., Gould, E.A. (2003).** Tick-borne encephalitis. *Antiviral Research*, 57, lk. 129-146.

**Hasan, S. S., Sevvana, M., Kuhn, R. J. and Rossmann, M. G. (2018).** Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. *Nature Structural & Molecular Biology.* 25: 13-20.

- Heinz, F. X., Allison, S. L. (2000).** Structures and mechanisms in flavivirus fusion. *Advances in Virus Research*, 1k. 231-269.
- Kaiser, R. (2008).** Tick-Borne Encephalitis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 22 (3), 1k. 561-575.
- Kielian, M., Chatterjee, P. K., Gibbons, D. L., Lu, Y. E. (2000).** Specific Roles for Lipids in Virus Fusion and Exit Examples from the Alphaviruses. *Fusion of Biological Membranes and Related Problems*, 34, 1k. 409-455.
- Khromykh, A. A., Kenney, M. T., Westaway, E. G. (1998).** Trans-complementation of flavivirus RNA polymerase gene NS5 by using Kunjin virus replicon-expressing BHK cells. *Journal of Virology*, 72(9), 1k. 7270-7279.
- Krupovic, M., Dolja, V.V., Koonin, E.V. (2019)** Origin of viruses: primordial replicators recruiting capsids from hosts. *Nature Reviews Microbiology* 17, 1k. 449-458.
- Kuno, G., Chang, G.-J., Tsuchija, K. R, Karabatsos, N., Cropp, C. B. (1998)** Phylogeny of the Genus Flavivirus. *Journal of Virology*, 72 (1), 1k. 73-83.
- Li, L., Lok, S.-M., Yu, I.-M., Zhang, Y., Kuhn, R. J., Chen, J., & Rossmann, M. G. (2008).** The Flavivirus Precursor Membrane-Envelope Protein Complex: Structure and Maturation. *Science*, 319 (5871), 1k. 1830-1834.
- Lindenbach, B. D., and C. M. Rice. (2001).** *Flaviviridae: the virus and their replication*, 4th ed. Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, PA, 1k. 1103-1113.
- Lindenbach, B. D., Thiel, H-J. and Rice, C. M. (2007).** *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*, p. 1101-1133. In: Knipe, D. M. and Howely, P. M. and editors, *Fields Virology*, 5th edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Lorenz, I. C., Kartenbeck, J., Mezzacasa, A., Allison, S. L., Heinz, F. X., & Helenius, A. (2003).** Intracellular Assembly and Secretion of Recombinant Subviral Particles from Tick-Borne Encephalitis Virus. *Journal of Virology*, 77(7), 1k. 4370-4382.
- Lu, G., Gong, P. (2017).** A structural view of the RNA-dependent RNA polymerases from the Flavivirus genus. *Virus Research*, 234, 1k. 34-43.
- Mackenzie, J. M., & Westaway, E. G. (2001).** Assembly and Maturation of the Flavivirus Kunjin Virus Appear To Occur in the Rough Endoplasmic Reticulum and along the Secretory Pathway, Respectively. *Journal of Virology*, 75(22), 1k. 10787-10799.

- Mandl**, C.W., Kunz, C., Heinz, F.X., 1991. Presence of poly(A) in a flavivirus: significant differences between the 3 noncoding regions of the genomic RNAs of tick-borne encephalitis virus strains. *J. Virol.* 65, lk. 4070-4077.
- Miorin**, L., Maiuri, P., Hoenninger, V. M., Mandl, C. W., Marcello, A. (2008). Spatial and temporal organization of tick-borne encephalitis flavivirus replicated RNA in living cells. *Virology*, 379(1), lk. 64-77.
- Modis**, Y., Ogata, S., Clements, D., & Harrison, S. C. (2004). Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*, 427(6972), lk. 313-319.
- Monath**, T. P., & Barrett, A. D. (2003). Pathogenesis and Pathophysiology of Yellow Fever. *Advances in Virus Research*, lk. 343-395.
- Morrison**, J., Laurent-Rolle, M., Maestre, A. M., Rajsbaum, R., Pisanelli, G., Simon, V., Mulder, L. C., Fernandez-Sesma, A., & García-Sastre, A. (2013). Dengue virus co-opts UBR4 to degrade STAT2 and antagonize type I interferon signaling. *PLoS pathogens*, 9(3).
- Murray**, N. E A., Quam, M. B, Wilder-Smith, A. (2013) Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clinical Epidemiology*. 5, lk. 299-309.
- Ng**, W. C., Soto-Acosta, R., Bradrick, S. S., Garcia-Blanco, M. A., Ooi, E. E. (2017). The 5' and 3' Untranslated Regions of the Flaviviral Genome. *Viruses*, 9(6), lk. 137.
- Pletnev**, A.-G., Men, R. (1998). Attenuation of the Langat tick-borne flavivirus by chimerization with mosquito-borne flavivirus dengue type 4. *PNAS*, 95(4), lk. 1746-1751.
- Porterfield**, J.S. (1975). The basis of arbovirus classification. *Medical Biology* 53, lk. 400-405.
- Roby**, J. A., Funk, A. and Khromykh A. (2012). Flavivirus replication and assembly, p. 21-39. In: Shi, P., *Molecular Virology and Control of Flaviviruses*, Caister Academic Press, Great Britain.
- Selisko**, B., Canard, B., Wang, C., Harris, E. (2014). Regulation of Flavivirus RNA synthesis and replication. *Current opinion in virology*. 9. Lk. 74-83.
- Shapoval** AN, Kamalov II, Denisova Eiu, Sokolova ED, Luzin PM, Shamarina AG, Gusmanova AG, Pinaeva NI (1989). Study of the distant consequences of immunizing people with a live vaccine against tick-borne encephalitis (vene keeles). *Tr Inst Im Pastera*. 65: lk. 133-135.

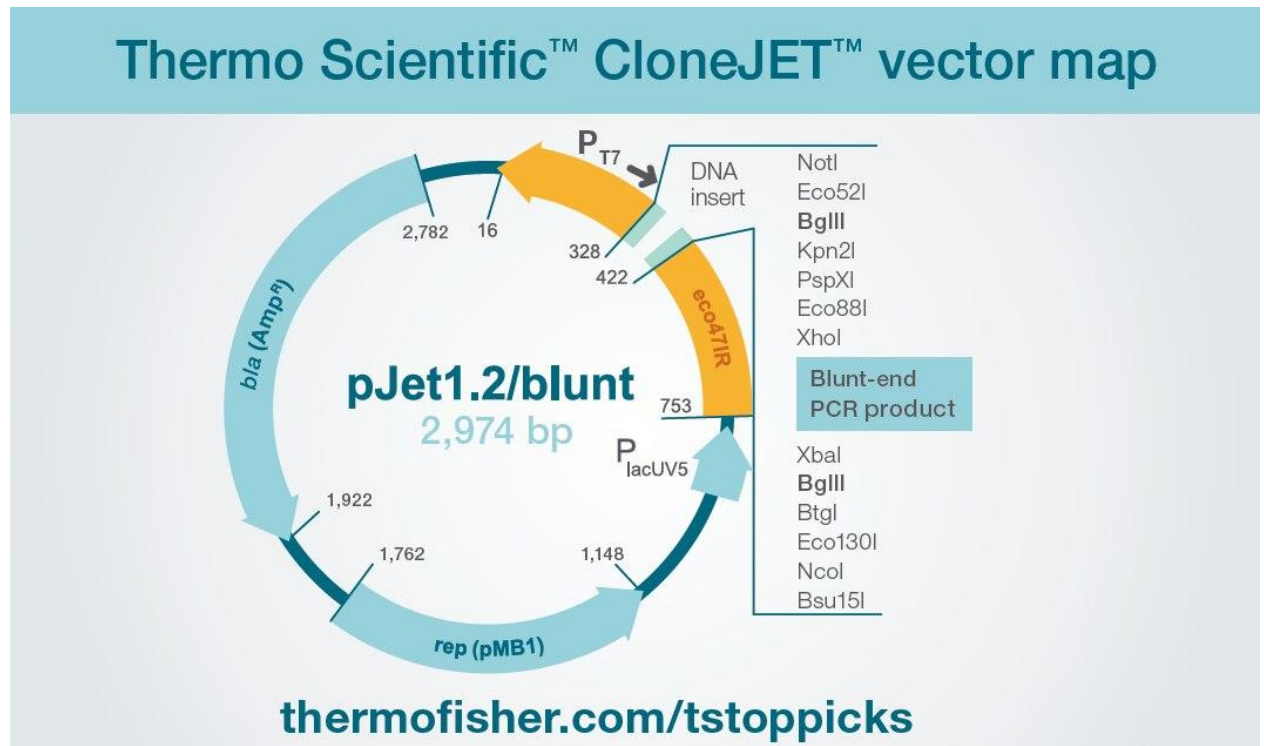
- Stadler**, K., Allison, S. L., Shalich, J., Heinz, F. X. (1997) Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *Journal of Virology*. 71(11), lk. 8475-8481.
- Staples**, J. E., Monath, T. P. (2008). Yellow Fever: 100 Years of Discovery. *JAMA*, 300(8), lk. 960.
- Strauss**, J. H. and Strauss, E. G. (2008). Genus Flavivirus, p. 107-112. In: *Viruses and Human Diseases*, 2nd edition, Elsevier Academic Press, Canada.
- Sutton**, T. D. S, Hill, C. (2019). Gut Bacteriophage: Current Understanding and Challenges. *Frontiers in Endocrinology*. 10. Lk. 784.
- Süss**, J. (2008) Tick-borne encephalitis in Europe and beyond – the epidemiological situation as of 2007. *Eurosurveillance*. 13 (26).
- Uchil**, P. D. and Satchidanandam, V. (2003). Architecture of the flaviviral replication complex. *The Journal of Biological Chemistry*. 278, lk. 24388-24398.
- Werme**, K., Wigerius, M., Johansson, M. (2008). Tick-borne encephalitis virus NS5 associates with membrane protein scribble and impairs interferon-stimulated JAK-STAT signalling. *Cellular Microbiology*, 10(3), lk. 696-712.
- Yoshii**, K. (2019). Epidemiology and pathological mechanisms of tick-borne encephalitis. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 81(3), lk. 343-347.
- Yu**, I.-M., Zhang, W., Holdaway, H. A. et al (2008). Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation. *Science*, 319(5871), lk. 1834-1837.

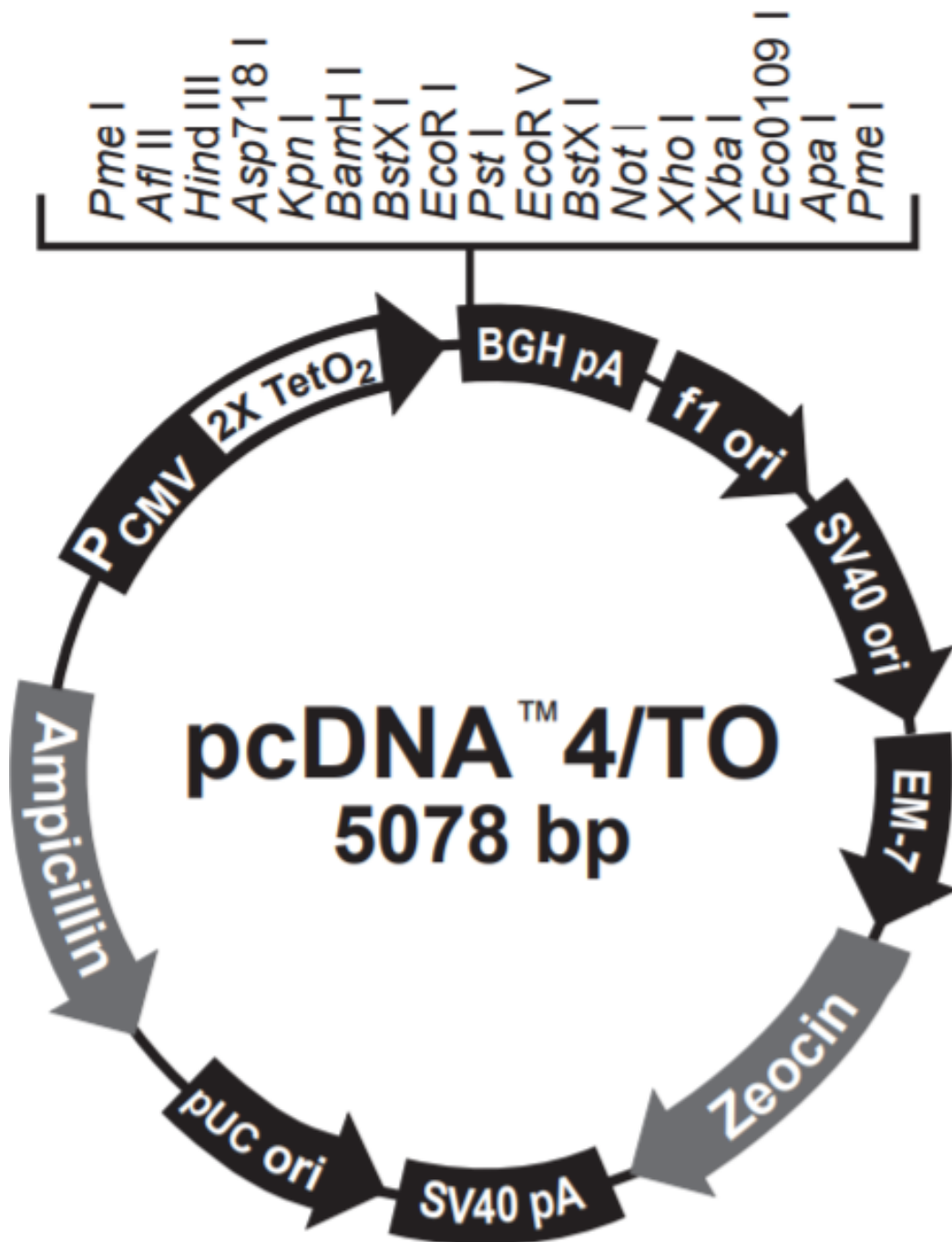
## KASUTATUD VEEBIAADRESSID

1. World Health Organization (WHO). Flavivirus epidemics (2016) (27.10.2019)  
(<https://www.who.int/csr/disease/epidemic-focus/flavivirus-epidemics/en/>)
2. World Health Organization (WHO). Yellow fever virus. (2019) (19.03.2020)  
(<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever>)
3. World Health Organization (WHO). Dengue and severe Dengue (2019) (19.03.2020)  
(<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>)
4. World Health Organization (WHO). Japanese encephalitis virus (2019) (19.03.2020)  
(<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/japanese-encephalitis>)
5. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Tick borne encephalitis (19.03.2020)  
(<https://www.ecdc.europa.eu/en/tick-borne-encephalitis/facts/factsheet>)
6. Centre for Disease Prevention and Control (CDC). Tick borne encephalitis (2019) (19.03.2020)  
(<https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/travel-related-infectious-diseases/tickborne-encephalitis>)
7. encephalitis.info. Tick borne encephalitis (2020) (02.06.2020)  
(<https://www.encephalitis.info/tick-borne-encephalitis>)

LISAD

Lisa 1







## Lisa 3

### PCR praimerite järjestused

#### 1. CMV\_Pme\_F

CGCGTTTAAACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAG

#### 2. CMV\_Env\_R

CTCATGTTCAAGCCCAGCCATGGTTTCGAATGTAATTGTAAATAGTAATTGTA  
ATG

#### 3. Env\_CMV\_F

ACAATTACATTCGAAACCATGGCTGGGCTTGAACATGAGGAACCC

#### 4. NS1\_Avr\_R

ATACCTAGGTCCAGCCAGACTGGCCGGTAGAAAC

#### 5. BstBI\_NS5\_F

ATATTCGAATGCGGCCCTTGGCGCTTGG

#### 6. SwaI\_NS5\_R

ATAATTTAAATTTAAAATATTGAGCTCTCCAGTTTGAGCTCCCAGTG

#### 7. NS5\_Avr\_F

ATACCTAGGACCATGGGTGGATCCGAGGGAGACACC

#### 8. NS5\_AfeI\_R

ATAAGCGCTAAATATTGAGCTCTCCAGTTTGAGCTCCCAG

# LIHTLITSENTS

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, **Marilin Kuusk**,

(sünnikuupäev 16.09.1998)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose “**Langat viiruse RNA polümeraasi ja replikaasi ekspressioonikonstruktide kloneerimine ja analüüs**”, mille juhendajad on MD, DSc Eva Žusinaite ja MSc Sandra Koit reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

*Marilin Kuusk*

**08.06.2020**